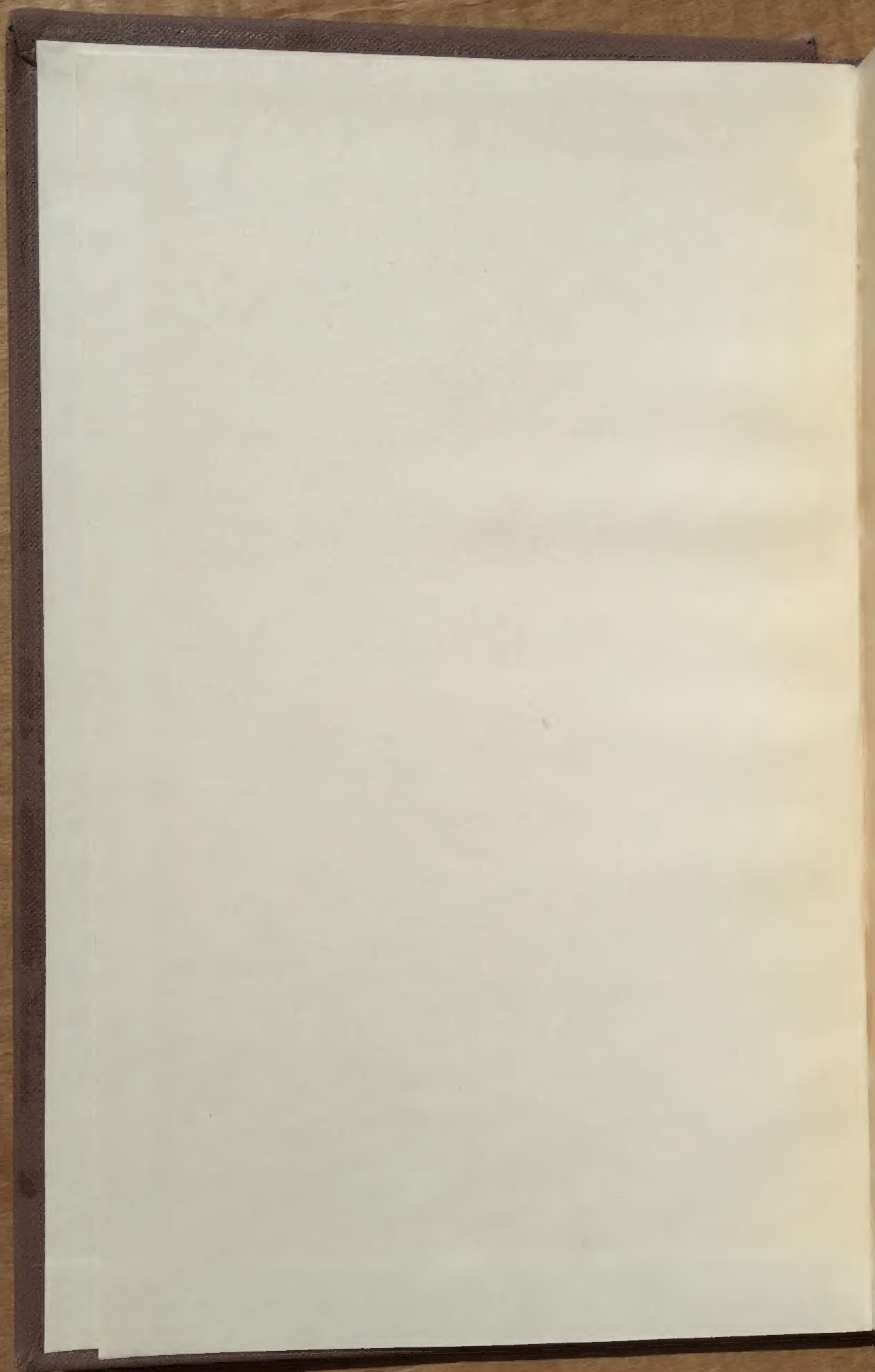


С. БЕРНХАРД

# СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ФЕРМЕНТОВ







SIDNEY A. BENNARD  
Professor of Chemistry



ИЗДАТЕЛЬСТВО

«МИР»

THE  
STRUCTURE  
AND  
FUNCTION  
OF  
ENZYMES

W. A. BENNARD, INC.  
NEW YORK - AMSTERDAM



SIDNEY A. BERNHARD  
University of Oregon

THE  
STRUCTURE  
AND  
FUNCTION  
OF  
ENZYMES

W. A. BENJAMIN, INC.  
NEW YORK-AMSTERDAM 1968

С. БЕРНХАРД

СТРУКТУРА

И

ФУНКЦИЯ

ФЕРМЕНТОВ

Перевод с английского  
Л. М. Гинодмана и

Под редакцией и с  
акад. А. Е. Браунштейна

ИЗДАТЕЛЬСТВО



С. БЕРНХАРД

**СТРУКТУРА**

---

**И**

---

**ФУНКЦИЯ**

---

**ФЕРМЕНТОВ**

---

*Перевод с английского  
Л. М. Гинодмана и И. И. Рапановича*

*Под редакцией и с предисловием  
акад. А. Е. Браунштейна*

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» МОСКВА 1971



Сжатое и вместе с тем очень доступное изложение проблемы функции ферментов в ее структурном, кинетическом, химическом и биологическом аспектах. Особое внимание уделяется химическим и биологическим соотношениям между структурой и функцией. Книга содержит много новых данных о структуре большого числа ферментов и о ее влиянии на процесс катализа, а также описание новых «релаксационных методов», применяющихся для исследования быстротекущих реакций. Усвоению материала помогают многочисленные иллюстрации.

Предназначена для студентов и преподавателей биологических и химических факультетов, а также для научных работников различных специальностей (химиков-органиков, биохимиков, биофизиков, молекулярных биологов и т. д.).

*Редакция биологической литературы*

Инд. 2-10-2  
100-70

ПРЕДИСЛО

В экспериментальное рассмотрение всех более сложных, связанных с функцией организмов, видов, глубже и шире вы

Солидное знание математики стало необходимым багажом не только для специалистов био-физиологии, но и для биологических дисциплин. В фундаментальной биологии и физиологии поступательного движения в первой половине нашего века

В соответствии с расширением требований к биохимии, которая в ее современном понимании, представляет собой вопросы молекулярной структуры и развития теоретических основ биологии. В этой области быстро развивающиеся науки — молекулярная биология, генетика, цитология — несколько лет изрядно обновляли учебные курсы молекулярной биологии.



преде-  
ульта-  
мент-  
мами  
орма-  
общих  
о по-  
ссят-  
части  
енную  
в-фор-  
S—S-  
ми ха-  
Каг-  
). Эта  
еющи-  
нукле-  
разд. 2  
гисти-  
которые,  
анизме,

M. J. In 2-  
Biol.



9. Кинетика быстротекущих стадий . . . . .	126
10. Релаксационные методы и обратимые системы . . . . .	131
Литература . . . . .	142
<b>Глава V. Анатомия ферментов . . . . .</b>	<b>143</b>
1. Последовательность аминокислот в белках . . . . .	145
2. Дисульфидные мостики . . . . .	155
3. Специфическая агрегация полипептидов в олигомерные структуры . . . . .	160
4. Активные и неактивные конформации белка . . . . .	161
5. Денатурация белков . . . . .	164
6. Влияние модификации определенных аминокислотных остатков на активность ферментов . . . . .	171
Литература . . . . .	184
<b>Глава VI. Схемы механизмов и модели ферментативного ка-     тализа . . . . .</b>	<b>186</b>
1. Нуклеофильный и электрофильный катализ . . . . .	187
2. Общий кислотно-основной катализ . . . . .	197
3. Скорость переноса протонов . . . . .	202
4. Внутримолекулярный катализ . . . . .	207
Литература . . . . .	217
<b>Глава VII. Коферменты и кофакторы. Модели ферментов и     механизмы их действия . . . . .</b>	<b>218</b>
1. Катализ с участием пиридоксальфосфата . . . . .	221
2. Реакции с участием тиаминапирофосфата . . . . .	228
3. Пиридиновые нуклеотиды . . . . .	230
4. Тиоловые коферменты . . . . .	232
5. Флавины и гемсодержащие соединения . . . . .	244
Литература . . . . .	248
<b>Глава VIII. Ферментативный катализ; характерные примеры .</b>	<b>249</b>
1. $\alpha$ -Химотрипсин и другие ферменты с активным остатком серина . . . . .	250
2. Рибонуклеаза . . . . .	269
3. Ферменты, нуждающиеся в пиридоксальфосфате . . . . .	274
4. Дегидрогеназы, реагирующие с участием пиридиновых нуклеотидов . . . . .	285
5. Аллостерические ферменты: изоцитратдегидрогеназа и аспартаттранскарбамилаза . . . . .	296
6. Ферменты, трехмерная структура которых известна . . . . .	310
Литература . . . . .	326
<b>Приложения . . . . .</b>	<b>330</b>



## ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

В экспериментальный анализ и теоретическое рассмотрение всех проявлений жизни — вплоть до наиболее сложных, связанных с деятельностью и эволюцией организмов, видов и биологических сообществ — все глубже и шире внедряются методы точных наук.

Солидное знание основ современной химии, физики, математики стало теперь неотъемлемой частью научного багажа не только студентов и преподавателей специальных био-физико-химических предметов, но и любого представителя так называемых «классических» биологических дисциплин. Более того, без знакомства с фундаментальными достижениями биохимии и молекулярной биологии нельзя осмыслить общую картину поступательного движения науки и культуры во второй половине нашего века.

В соответствии с этим, непрерывного обновления и расширения требуют те разделы университетских курсов биохимии, которые трактуют вопросы *энзимологии* в ее современном, физико-химическом или «молекулярном» понимании. Речь идет о неразрывно связанных между собой вопросах, касающихся, с одной стороны, молекулярной структуры ферментов и, с другой — природы их специфического каталитического действия. В этой области накопление экспериментальных данных и развитие теоретических представлений происходит необычайно быстро — главы учебников биохимии, относящиеся к структуре и функции ферментов, успевают за несколько лет изрядно устареть.

Обновление учебных программ и углубление профессиональной подготовки специалистов в области дисциплин молекулярно-биологического цикла облегчается



оперативным изданием небольших специализированных учебных пособий, написанных на вполне современном уровне, но в доступной форме. Именно к такого рода пособиям и принадлежит предлагаемая вниманию читателей книга профессора С. Бернхарда «Структура и функция ферментов».

Книга вышла в серии монографий, составляющих основу преподавания биохимии студентам старших курсов и аспирантам в университетах США. Автор ее — опытный преподаватель энзимологии и квалифицированный исследователь, научные интересы которого лежат в области изучения механизма и кинетики ферментативных реакций. Отправляясь от материала общих курсов физической, органической и биологической химии, а также молекулярной физики полимеров, С. Бернхард вводит читателя в круг актуальных проблем химии белков-ферментов и различных уровней их макромолекулярной структуры, знакомит его с современными подходами к выяснению природы химических взаимодействий, лежащих в основе ферментативного катализа.

Этот трудный материал автор преподносит в логичной, ясной и доходчивой форме с наглядными иллюстрациями. При этом он успешно избегает перегрузки изложения фактическими данными и, опираясь на разбор отдельных, наиболее обстоятельно разработанных в эксперименте примеров, переходит от относительно простых к наиболее сложным аспектам увлекательного нового, только еще формирующегося раздела биоорганической и биофизической химии — химии ферментативного катализа.

При редактировании русского издания исправлены отдельные фактические неточности оригинала. Кроме того, в подстрочных примечаниях приведены некоторые важные новейшие данные.

А. Е. Браунштейн



## ГЛАВА I

### ВВЕДЕНИЕ

#### 1. КРАТКИЙ ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК

Механизм действия ферментов — одна из важных и интригующих проблем, стоящих перед химиками и биологами нашего времени. Для того чтобы правильно оценивать современные представления о механизме действия ферментов, полезно вкратце обрисовать историю открытий и теорий, которые оказали глубокое влияние на развитие этой проблемы.

Представление о том, что химические реакции в живых системах осуществляются с помощью особого механизма, отличного от механизма реакций, изучаемых в химических лабораториях, возникло более 200 лет назад. Лёб впервые показал, что живые системы можно расчленить на более мелкие единицы, которые сами по себе не могут рассматриваться как «живые»; тем не менее некоторые из них еще могут осуществлять определенные химические реакции, характерные для живых систем. В начале XIX в. широко бытовало представление о том, что такие субклеточные системы содержат некоторую часть «жизненной силы» организма и что «жизненная сила» каким-то образом придает этим системам способность управлять специфическими реакциями. Развитие более строгих химических представлений о природе действия подобных субклеточных систем («ферментов») стало возможным только с развитием общей теории химического катализа. Такая теория была выдвинута в 1835 г. шведским химиком Берцелиусом. При обсуждении своей теории Берцелиус приводил ряд примеров химического катализа, в том числе катализа ферментами. Он отметил громадную производительность ферментов (диастазы) по сравнению с неорганическими катализаторами



(например, серной кислотой) в каталитическом гидролизе крахмала. Берцелиус предположил, что «жизненная сила», считавшаяся ранее частью такой «субживой» ферментной системы, может на самом деле быть просто свойством самих химических реагентов и что роль катализаторов-ферментов заключается скорее в том, чтобы направить химические реакции по определенному пути, а не в том, чтобы сообщить химическим соединениям особую реакционную способность (или энергию), необходимую для участия в физиологических процессах. Столь блестящей и значительной была эта первая статья по катализу, опубликованная в шведском журнале, что уже в следующем (1836) году известный немецкий химик Ф. Вёлер перевел ее на немецкий язык. Вопросы, поднятые Берцелиусом в этой статье, имели важное значение в исследованиях по катализу в течение многих десятилетий. Среди этих вопросов были следующие: 1) определяются ли конкретные продукты химической реакции природой катализатора? 2) может ли катализатор действовать на широкий набор реагентов или его каталитическое действие ограничено одной-единственной химической реакцией?

Энзимологические работы XIX в. были посвящены в основном выделению субклеточных ферментных систем и описанию химических реакций, катализируемых ими. Почти всегда обнаруживалось, что дальнейшая очистка ранее изученной ферментной системы приводила к разделению ее на фракции, причем каждая фракция обладала меньшим разнообразием каталитических функций. Стало очевидным, что выделявшиеся первоначально ферментные системы состоят из многих различных катализаторов, каждый из которых увеличивает скорость небольшого числа определенных химических реакций. (Число различных биологических катализаторов, идентифицированных к настоящему времени в лабораториях, огромно. Например, простая бактерия содержит приблизительно  $10^4$  различных ферментов.)<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Указанная автором цифра явно преувеличена. Общее число известных в настоящее время ферментов — примерно 1500. — Прим. ред.



Параллельно с открытием большого числа катализаторов, относящихся к категории ферментов, и выявлением их узкой специфичности накапливалась огромная информация по каталитическому действию простых неорганических и органических соединений, в частности кислот, оснований, тяжелых металлов и их солей. На основе полученных данных был сделан вывод, что эти небиологические катализаторы проявляют в катализируемых ими химических реакциях значительно меньшую специфичность, чем ферменты. Оказалось, например, что такое простое вещество, как серная кислота, катализирует широкий круг превращений разнообразных органических и неорганических соединений.

К середине XIX в. можно было сделать следующие обобщения относительно характера действия ферментов:

1. Скорость реакции, катализируемой ферментом, обычно значительно больше скорости той же реакции, протекающей в присутствии катализатора небиологической природы.

2. Ферменты в отличие от других катализаторов, изучаемых в лабораториях, высокоспецифичны и катализируют обычно только одну или несколько химических реакций.

3. Существует чрезвычайно большое число ферментов, каждый из которых выполняет строго определенные функции. Сложные биологические процессы включают в себя целый ряд различных последовательных химических реакций, осуществляемых с помощью большого числа ферментов.

Коренной вопрос, на который предстояло ответить, заключался в следующем: как осуществляют ферменты столь быстрый и высокоспецифичный катализ? Решение его составляет и в настоящее время главную задачу большого круга исследователей. На протяжении последних ста лет было накоплено очень большое количество фактических данных и теорий, имеющих отношение к этому вопросу. Эти данные и те идеи, которые позволяют подойти ближе к пониманию механизма (или механизмов) действия ферментов, являются предметом настоящей книги. В этой главе мы рассмотрим



экспериментально обоснованные обобщения относительно структуры и механизма действия ферментов, ставшие в настоящее время аксиомами. На них мы будем часто ссылаться в последующих главах.

## 2. АКСИОМЫ

В этом разделе кратко изложены аксиомы энзимологии. Их обоснование ограничено здесь описанием экспериментальных результатов, имевшихся в распоряжении исследователей в то время, когда эти аксиомы были сформулированы впервые. В последующих главах будут более подробно рассмотрены экспериментальные и теоретические данные, относящиеся к этой проблеме.

*Ферменты принадлежат к классу широко распространенных в природе биологических молекул, называемых белками.*

Белки — это соединения, содержащие в основном следующие элементы: углерод ( $\sim 60$  вес.%), азот ( $\sim 16\%$ ), кислород ( $\sim 16\%$ ) и водород ( $\sim 8\%$ ). Обычно они содержат также небольшое количество серы. Для всех ферментов характерен элементарный состав, типичный для белков.

*Белки (ферменты) являются очень большими молекулами (макромолекулами).*

Белки не могут проникать через многие виды мембран, через которые свободно проходят менее крупные молекулы разных типов (фиг. 1).

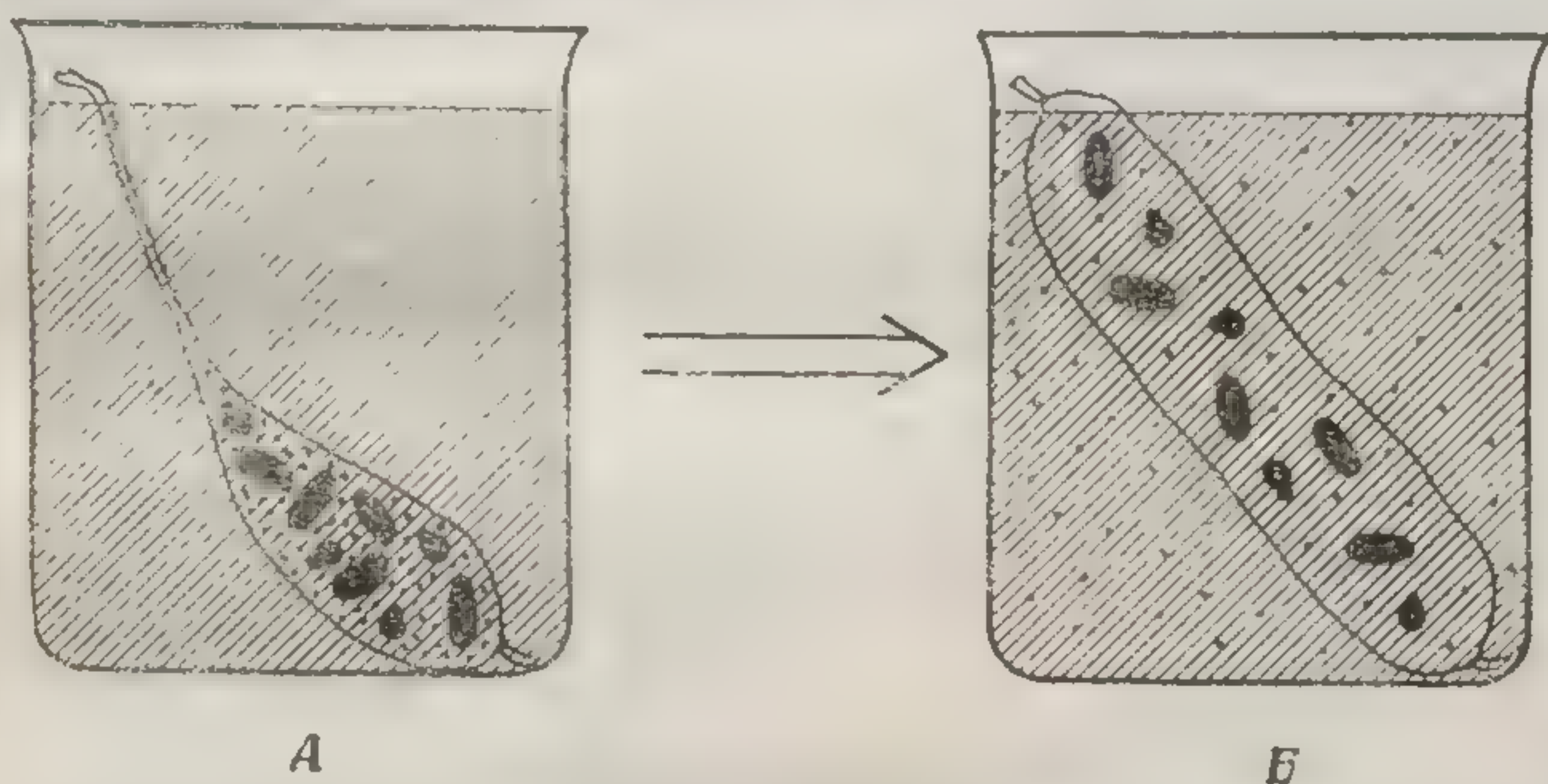
Определение тех физических свойств, которые зависят от *числа* молекул растворенного вещества (например, осмотического давления растворов), показывает, что *число* белковых молекул в растворе, приходящееся на единицу веса белка, необычно мало. Молекулярные веса белков, определенные таким способом, лежат в пределах  $10^4$ — $10^6$  г белка на 1 моль.

Определение тех физических свойств, которые зависят от *массы* молекул растворенного вещества (в особенности скорости седиментации при центрифугировании), также показывает, что молекулы белков обла-



дают очень большой массой (молекулярный вес  $\sim 10^4 - 10^6$ ).

И наконец, определение тех физических свойств, которые зависят от *размеров* молекул растворенного вещества (например, рассеяния монохроматического света монодисперсным раствором белка), показывает, что



Фиг. 1. Опыт по диализу.

А. Большие молекулы белка не могут пройти сквозь поры мембраны, тогда как молекулы воды и небольшие ионы проникают свободно. Б. Так как концентрация белка внутри диализационного мешочка высока, в него поступает растворитель (вода) до тех пор, пока осмотическое давление внутри и снаружи мешочка не станет одинаковым.

у водорастворимых белков размеры молекул соответствуют вышеприведенным молекулярным весам. Степень рассеяния света монодисперсным раствором (т. е. раствором, в котором растворенное вещество распределено гомогенно) зависит от отношения размеров молекул растворенного вещества к длине волны монохроматического света.

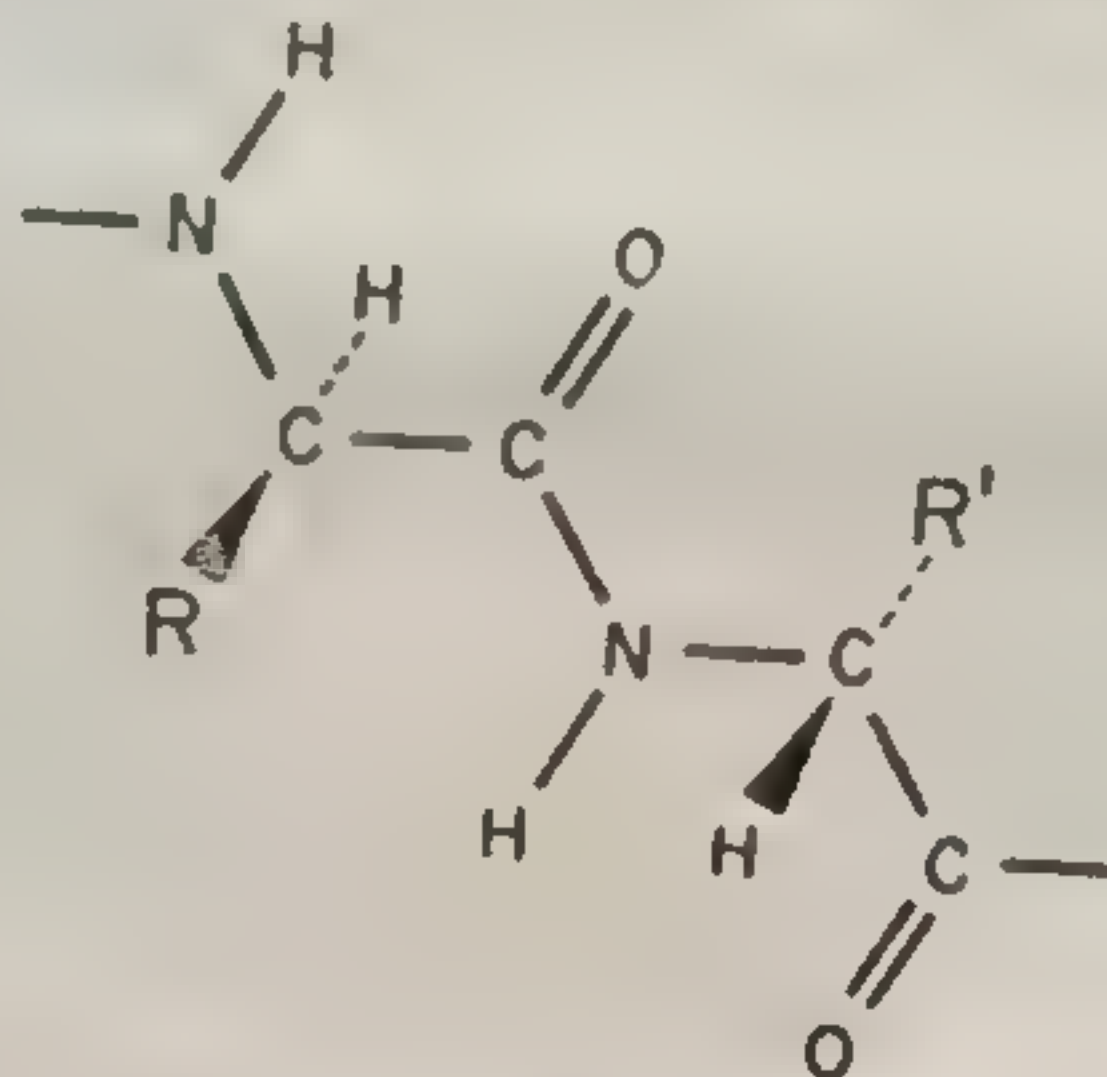
*Белки (ферменты) построены из простых блоков (аминокислотных остатков), соединенных линейно ковалентными (пептидными) связями.*

Повторяющаяся единица ковалентной структуры белка изображена на фиг. 2. Одиночная неразветвленная цепь аминокислот, соединенных друг с другом *пептидными* связями, называется *полипептидом*. В гл. V будет показано, что молекулы фермента могут либо



состоять из одной полипептидной цепи, либо представлять собой специфический агрегат из нескольких цепей. Молекулярные веса, приведенные выше, варьируют в широких пределах, так как молекулы разных ферментов содержат различное число полипептидных цепей.

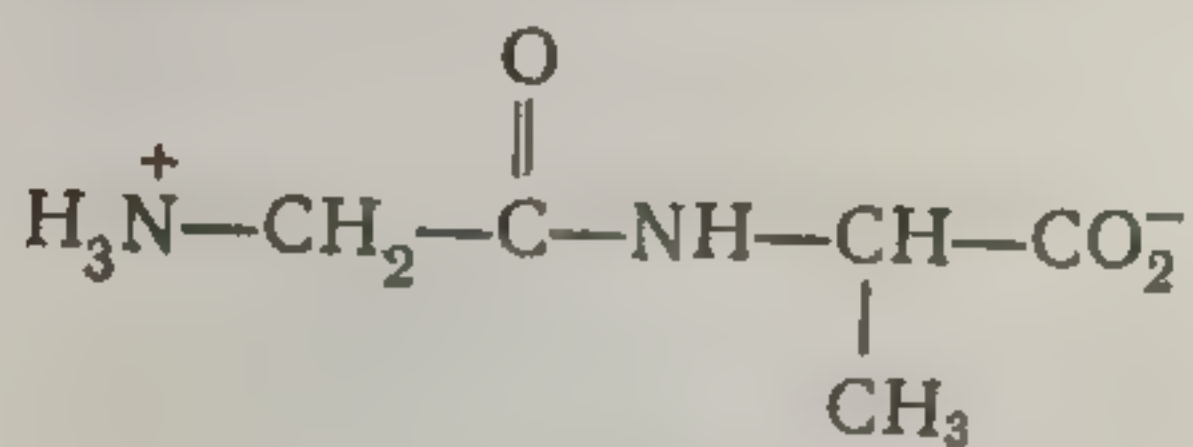
При полном разрушении белков путем продолжительного гидролиза водными растворами сильных кислот или оснований можно с хорошим выходом выделить из гидролизата определенное число низкомолекулярных



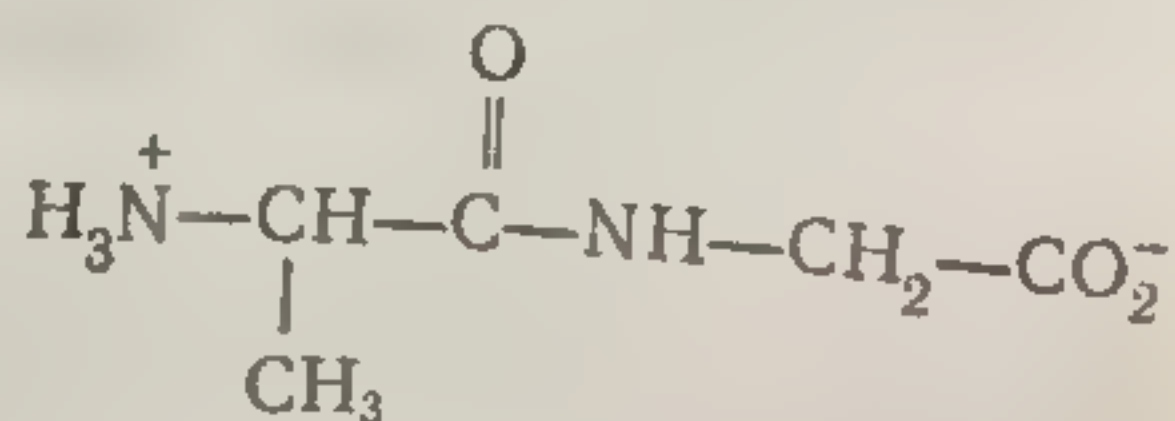
Фиг. 2. Повторяющаяся последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

аминокислот известной структуры. Аминокислоты, входящие в состав белков, приведены в табл. I. Следует обратить внимание, что аминокислоты отличаются друг от друга только боковыми радикалами (R). Двадцать аминокислот, обычно входящих в состав белка, расположены в таблице в соответствии со специфическими особенностями этих боковых цепей R.

Если подвергать белки неполному расщеплению (сокращая время гидролиза), то можно выделить пептиды известной структуры, например дипептиды глицил-аланин и аланилглицин:



Глицилаланин



Аланилглицин

(I. 1)



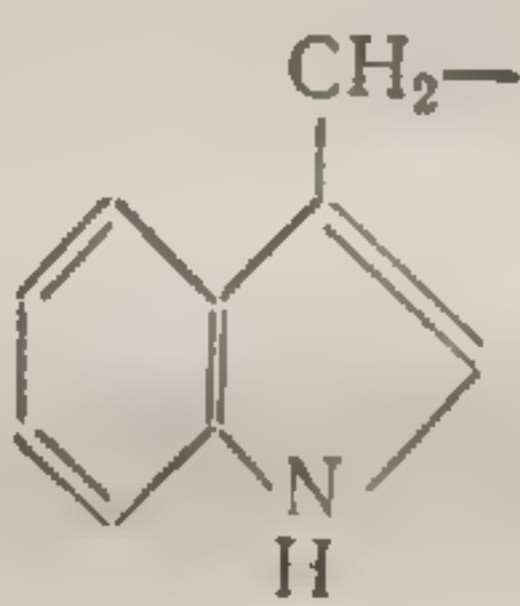
Таблица 1

## Классификация боковых цепей аминокислот

Тип и название аминокислоты	Структура боковой цепи	Примечание
<b>Гидрофобные аминокислоты</b> Аланин Валин Лейцин Изолейцин Фенилаланин	$\text{CH}_3-$ $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}- \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}_2- \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ \text{CH}- \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$ $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-$	Инертны. Взаимодействия обусловлены дисперсионными силами
<b>Заряженные аминокислоты</b> Аспарагиновая кислота Глутаминовая кислота Лизин Аргинин	$^-\text{O}_2\text{C}-\text{CH}_2-$ $^-\text{O}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagup \\ \text{C}=\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \\ \diagdown \\ \text{H}_2\text{N}^+ \end{array}$	Электростатические взаимодействия. Акцепторы водородных связей (анионы) или доноры (катионы)
<b>Оксиаминокислоты</b> Серин Треонин Тирозин	$\text{HO}-\text{CH}_2-$ $\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$	Доноры и акцепторы водородных связей. Дипольные взаимодействия

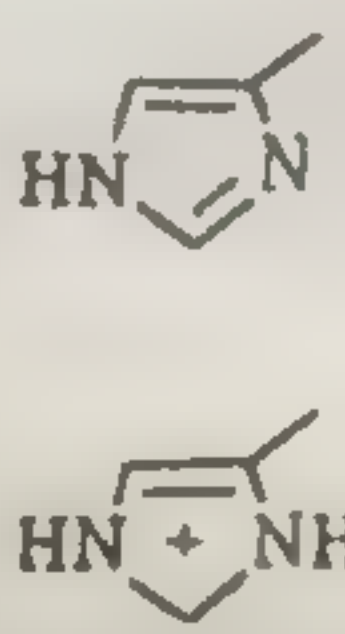
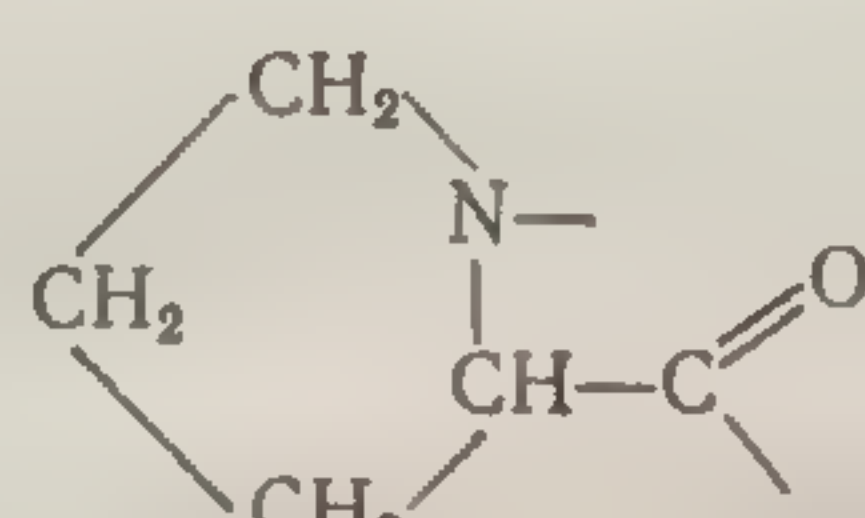


Продолжение

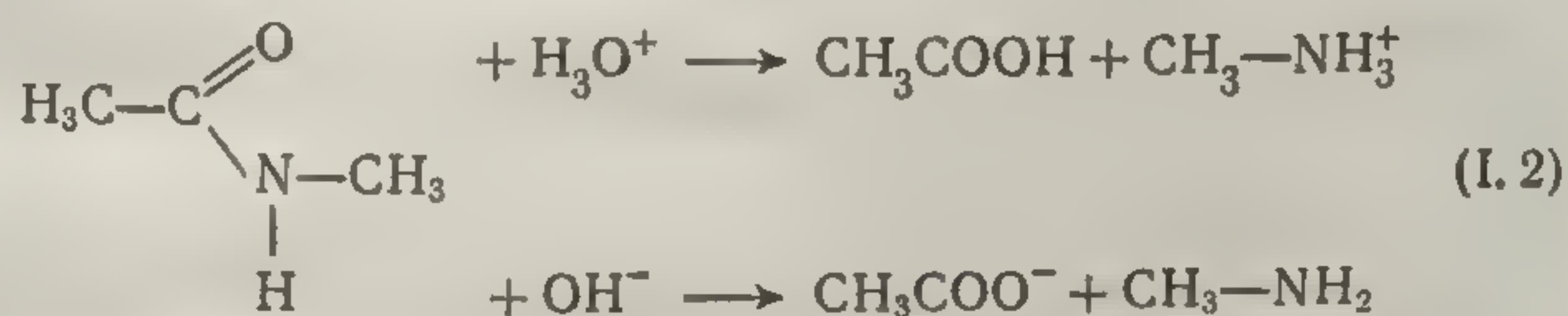
Тип и название аминокислоты	Структура боковой цепи	Примечание
Аминокислоты, содержащие инертный гетероатом Метионин  Триптофан	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  	Сходны с гидрофобными. Сильные дисперсионные взаимодействия
Амиды аминокислот  Аспарагин  Глутамин	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2- \end{array}$  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2- \end{array}$	Доноры и акцепторы водородных связей. Дипольные взаимодействия
Прочее Глицин	H—	Нет β-углеродного атома. Образует более гибкие пептидные цепи
Цистеин	HS—CH <sub>2</sub> —	Подобен серину, но способен к реакции образования цистина
Цистин	$\begin{array}{c}   \\ \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}- \\   \\ \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}- \\   \end{array}$	Образует поперечные связи в полипептидных цепях. Существенно ограничивает гибкость полипептида



## Продолжение

Тип и название аминокислоты	Структура боковой цепи	Примечание
Гистидин		Катион и сопряженное нейтральное основание существуют в сравнимых количествах при нейтральных значениях pH. Катион сходен с аргинином, нейтральная молекула — с фенилаланином. Принимает участие в образовании водородных связей.
Пролин		Иминокислота. Создает жесткое звено в пептидной цепи.

Кислотный и основной гидролиз белков происходит в условиях, сходных с условиями гидролиза амидов, например N-метилацетамида, гидролиз которого катализируют сильные кислоты или щелочи



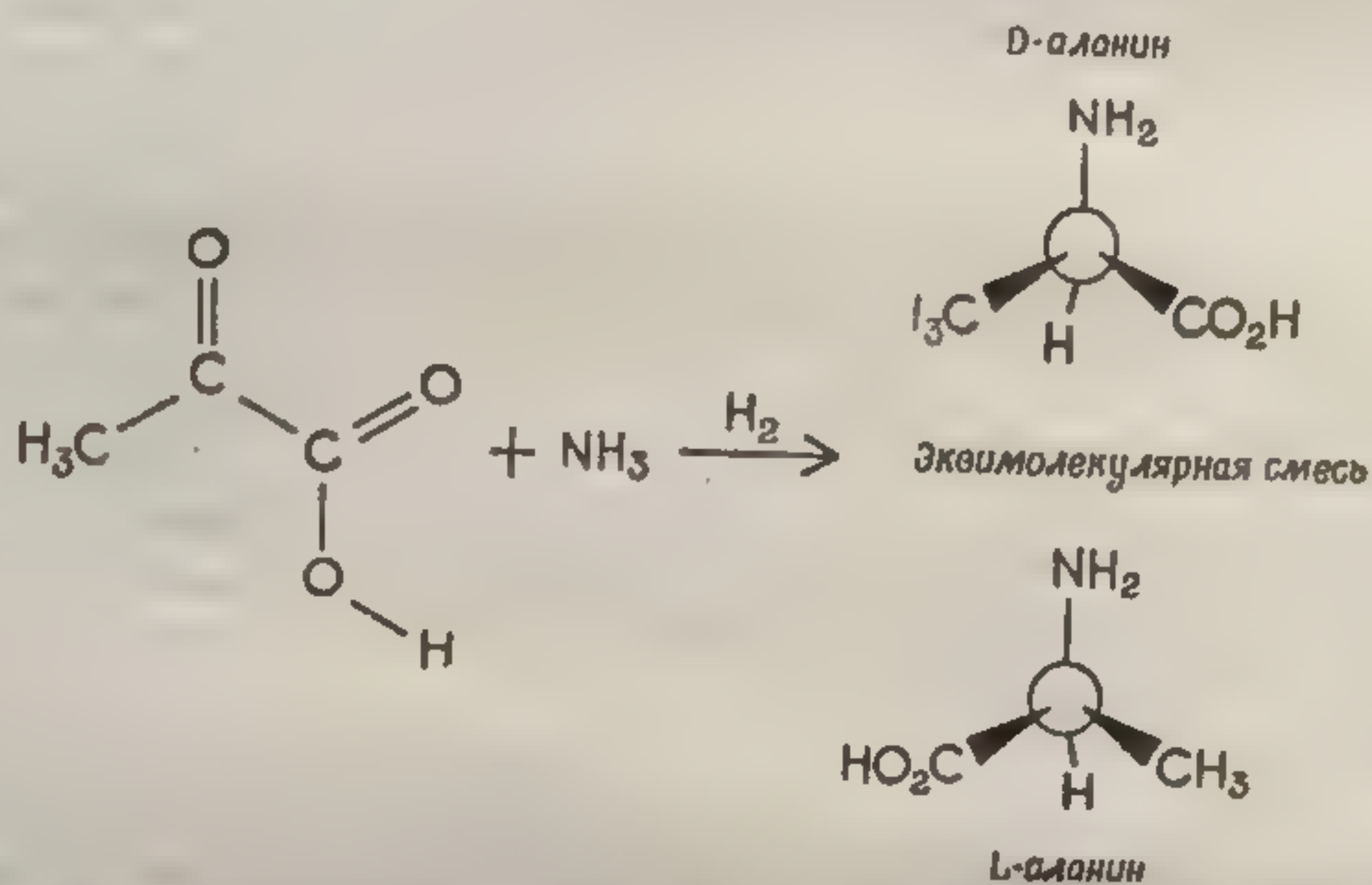
Все аминокислотные компоненты белков обладают одинаковой геометрической конфигурацией.

Следует отметить, что для всех аминокислот (кроме глицина) возможны две пространственно не совмещаемые конфигурации. Если аминокислоту синтезируют в лаборатории из исходных веществ, в которых отсутствует асимметрический тетраэдрический атом углерода (как, например, при восстановительном аминировании пировиноградной кислоты; фиг. 3), то образующийся



продукт неизменно оказывается эквимолекулярной смесью молекул обеих конфигураций. Такую смесь D- и L-аланина (или любой другой аминокислоты), называемую *рацемической* (DL-аланин), можно отличить от встречающегося в природе чистого L-изомера благодаря двум обстоятельствам:

1. Кристаллы рацемической смеси и L-изомера заметно отличаются друг от друга, так как эквимолекулярная смесь D- и L-молекул не может быть упакована



Фиг. 3. Восстановительное аминирование пировиноградной кислоты.

в ту же трехмерную структуру, которую образуют одни только L-молекулы. Точки плавления и геометрическая форма этих кристаллов могут быть различными, так как они зависят от расположения молекул в кристалле.

2. Растворы чистого L-изомера обладают *оптической активностью*, т. е. вращают плоскость поляризации падающего на них поляризованного света. Направление и степень вращения зависят от несимметрического *внутримолекулярного* распределения электронной плотности. Растворы D-аланина вращают плоскость поляризации на такой же угол, но в противоположном направлении. Все белковые растворы обладают оптической активностью. В DL-смеси аминокислот два противоположных эффекта оптического вращения взаимно компенсируются, что ведет к потере оптической активности.



Свойства каждого белка определяются характерной для него последовательностью аминокислотных остатков.

Каждый индивидуальный белок обладает уникальной линейной последовательностью аминокислот 20 различных видов, соединенных в пептидные цепи. Для каждого белка характерна не только определенная последовательность аминокислот, но также строго определенный процентный их состав. Аминокислотный состав некоторых белков, выполняющих самые разные функции, приведен в табл. 2.

Таблица 2

Аминокислотный состав некоторых полипептидных цепей, выполняющих различные функции

Аминокислота	Бычий инсулин	Лизоцим цыпленка	Гемогло- бин человека ( $\beta$ -цепь)	Белок вируса табачной мозаики	Химотрип- синоген быка
Аланин	3	12	15	11	22
Аргинин	1	11	3	9	4
Аспарагин	3	13	0	10	14
Аспарагиновая кислота	—	8	13	7	9
Валин	5	6	18	15	23
Гистидин	2	1	9	0	2
Глицин	4	12	13	6	23
Глутамин	3	3	0	12	10
Глутаминовая кислота	4	2	11	7	5
Изолейцин	1	6	0	7	10
Лейцин	6	8	18	13	19
Лизин	1	6	11	2	14
Метионин	—	2	1	1	2
Пролин	1	2	7	8	9
Серин	3	10	5	16	28
Тирозин	4	3	3	5	4
Треонин	1	7	7	17	23
Триптофан	—	6	2	3	8
Фенилаланин	3	3	8	8	6
Цистеин (полуци- стин)	6	8	2	1	10
Всего . . .	51	129	146	158	245



При детальном изучении строения пептидных фрагментов этих белков была определена полная линейная последовательность ковалентно связанных аминокислот для каждого из них. В гл. V будет показано, что эта полная линейная последовательность не могла бы быть определена, если бы огромное большинство белковых молекул одного типа не имело абсолютно одинаковой последовательности аминокислот. Был идентифицирован ряд необычных (аномальных) гемоглобинов человека, различающихся в функциональном отношении. Оказалось, что эти различия обусловлены в каждом случае заменой одного-единственного аминокислотного остатка в полипептидной цепи.

Специфическая линейная последовательность аминокислотных остатков в полипептиде определяет не только его уникальные химические свойства, но также трехмерную структуру полипептидной цепи и специфическую агрегацию таких цепей в более сложные белковые структуры.

*Ферментные белки имеют упорядоченную структуру.*

Ферменты могут быть получены в кристаллическом состоянии. Направляя на такие кристаллы электромагнитное излучение с длиной волны, сравнимой с длиной химических связей (рентгеновские лучи), можно получить правильные дифракционные картины, характерные для кристаллических твердых тел, т. е. тел, в которых ядра атомов жестко фиксированы в определенных местах регулярной пространственной решетки. В ряде случаев было показано, что водные суспензии таких ферментных кристаллов обладают каталитической активностью. Следовательно, каталитическая функция фермента сохраняется в кристаллическом состоянии. С другой стороны, все ферменты (как и все другие белки) способны к денатурации — процессу, который приводит к разрушению упорядоченной структуры белка. Денатурация может произойти, например, при повышении температуры или при воздействии на белки особых растворителей (денатурирующих агентов), которые ослабляют нековалентные внутримолекулярные силы, ответственные за поддержание упорядо-



ченной структуры. Денатурированные белки не кристаллизуются. Денатурированные ферменты неизменно оказываются каталитически инертными, т. е. их ферментативная функция утрачивается. При этом в процессе денатурации не разрывается ни одной химической связи.

*Вывод: Целостность внутримолекулярной структуры существенна для каталитического действия фермента.*

*Каталитическое действие связано с определенным участком белковой молекулы фермента (активный центр).*

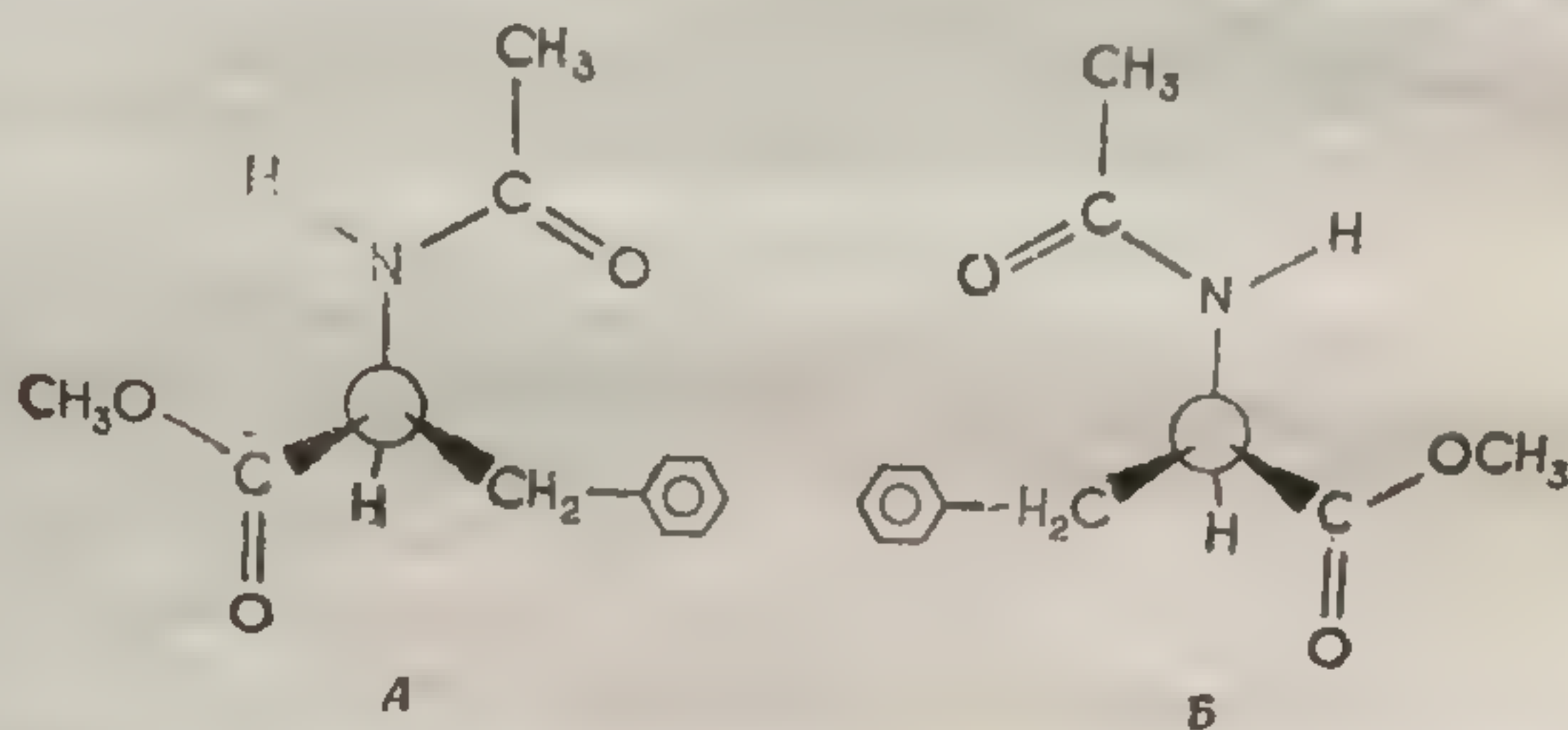
В конце прошлого и начале нынешнего века было выполнено два типа экспериментов, имеющих непосредственное отношение к этой аксиоме. В экспериментах первого типа исследовали связь между химической конфигурацией какого-либо потенциального реагента и способностью определенного фермента катализировать его превращение. В экспериментах другого типа для изучения механизма катализируемой реакции были использованы методы химической кинетики, основанные на изучении зависимости между скоростью реакции и концентрацией реагентов и катализатора. Детально исследуя зависимость скорости реакции от концентрации этих веществ, нередко можно прийти к заключению о том, каков механизм взаимодействия этих веществ в ходе катализируемой реакции.

На основе очень больших различий в скоростях ферментативного превращения органических молекул, весьма близких по своим химическим свойствам, но различных по стереохимической конфигурации, был сделан вывод о том, что ферменты высокоспецифичны в выборе *субстратов* (реагирующих веществ), имеющих определенную конфигурацию. Эмиль Фишер первым постулировал, что высокая степень стереоспецифичности, наблюдаемая при ферментативных процессах, должна отражать стереохимически *комплементарное* присоединение субстрата к ферменту в ходе катализа. Эта стереохимическая специфичность наиболее ярко проявляется в способности некоторых ферментов превращать либо только L-форму, либо только D-форму субстрата. Например, химотрипсин катализует гидро-



лиз метилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина (фиг. 4), но практически инертен по отношению к соответствующему D-изомеру — молекуле с идентичными химическими свойствами.

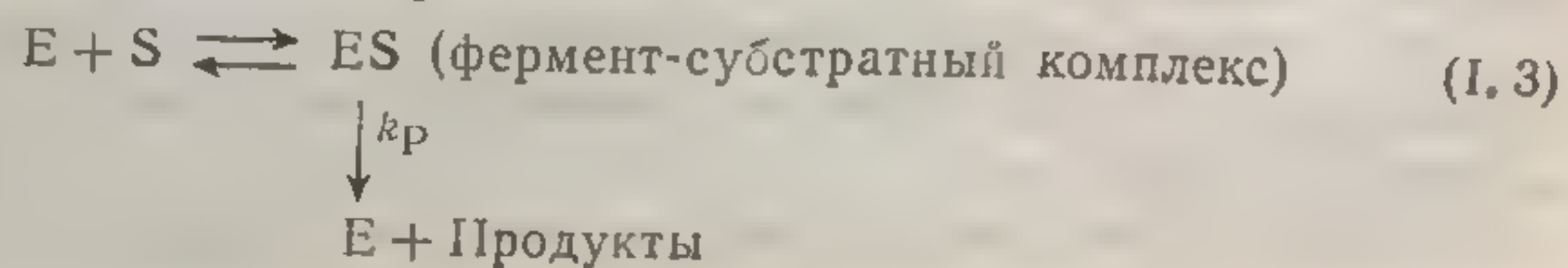
Интересно сопоставить размеры молекул фермента и субстрата. В приведенном выше примере молекулы субстрата имеют примерно такие же размеры, как и пептид, состоящий из двух аминокислотных остатков.



Фиг. 4. D- и L-изомеры метилового эфира N-ацетилфенилаланина. А. Соединение, являющееся субстратом. Б. Соединение, не являющееся субстратом.

Эта величина типична для комплементарных поверхностей фермента и субстрата. Так как молекула фермента (химотрипсин) содержит около 250 аминокислотных остатков, молекула субстрата составляет около 1% общей массы фермента и субстрата. В последующих разделах будет показано, что на одну молекулу химотрипсина приходится только один каталитический центр.

Постулат Фишера был использован специалистами по химической кинетике сначала для качественного, а позднее для количественного описания зависимости между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции. Путь, по которому протекают многие ферментативные реакции, можно формально изобразить следующим образом:





Если концентрация субстрата намного больше, чем концентрация активных центров фермента, или если скорость превращения фермент-субстратного комплекса (ES) значительно меньше, чем скорость диссоциации комплекса на фермент и субстрат, то скорость исчезновения субстрата или образования продукта можно определить при помощи следующего уравнения:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_p E_0}{1 + [E]/[ES]}, \quad (I. 4)$$

где  $E_0$  — общая концентрация активных центров ( $[E] + [ES]$ ). При условии что только небольшая доля активных центров образует комплекс (ES), скорость реакции определяется уравнением

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_p [ES] \approx k' E_0 [S], \quad (I. 5)$$

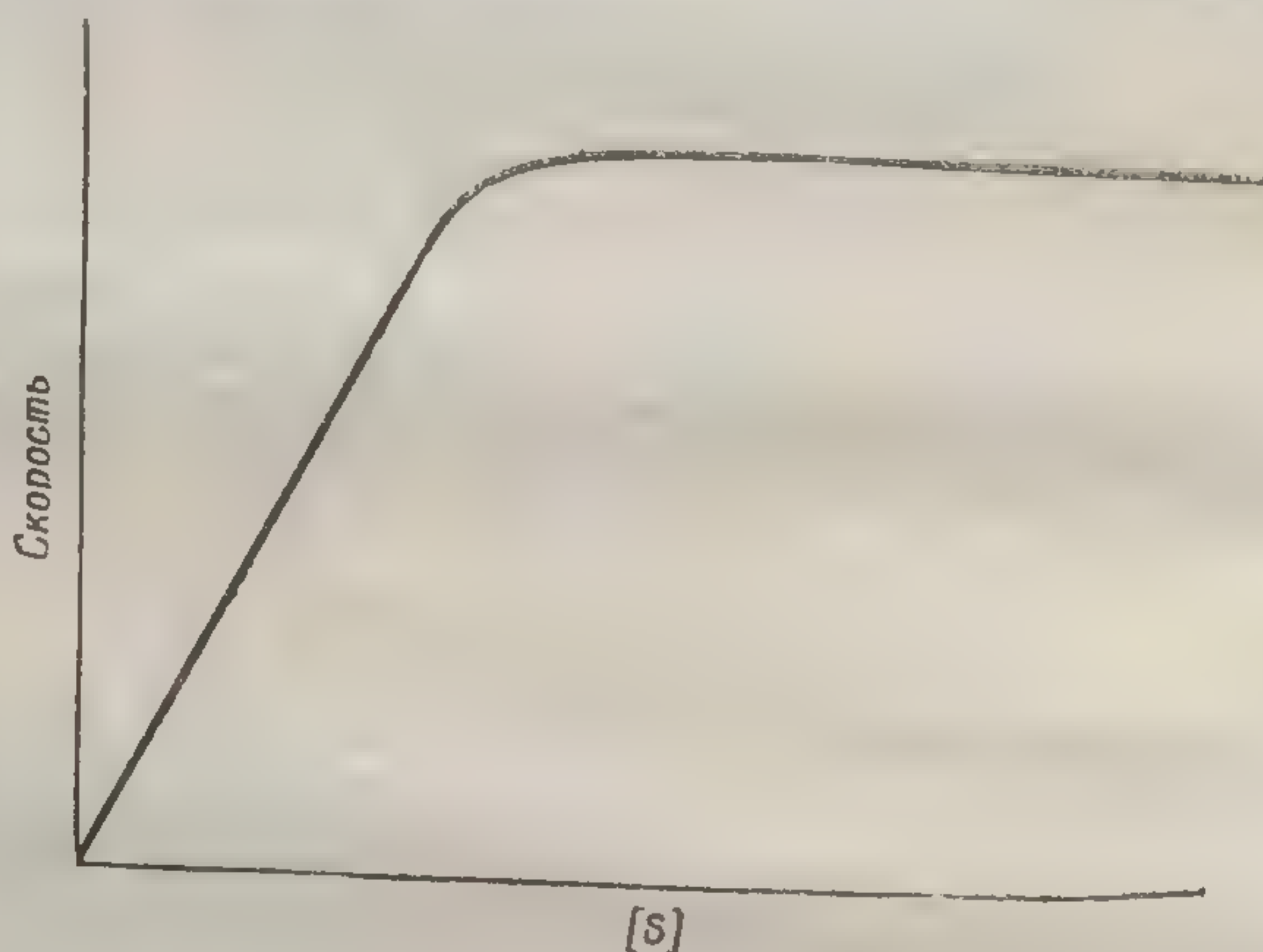
т. е. в данном случае проявляется зависимость скорости реакции от концентрации, характерная для гомогенных растворов низкомолекулярных веществ. С другой стороны, если в образовании комплекса принимает участие значительная доля активных центров, то зависимость скорости от концентрации можно выразить уравнением

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_p E_0 [S]}{K + [S]}, \quad K = \frac{[E][S]}{[ES]}. \quad (I. 6)$$

Уравнение (I.6) (подробный вывод которого приведен в гл. IV) общеизвестно как *уравнение Михаэлиса—Ментен*. Оно применимо ко многим ферментативным реакциям; подбирая соответствующие условия среды и концентрацию, можно показать, что оно применимо почти ко всем ферментативным реакциям. Следует отметить, что кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата при условии, что  $[S] > E_0$ , будет иметь вид, показанный на фиг. 5, и что при достаточно больших концентрациях субстрата ( $[S] > K$ ) скорость реакции становится независимой от концентрации субстрата. Подобную зависимость *нулевого порядка* можно



легко продемонстрировать на примере многих систем фермент—субстрат. Концентрации субстрата порядка  $10^{-3}$ — $10^{-5}$  М обычно достаточны для почти полного насыщения активных центров (когда  $[S] > K$ ,  $[ES] \approx E_0$ ). Этот феномен насыщения, характерный для системы фермент—субстрат, отражает сильное и специфичное



Фиг. 5. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата для фермент-субстратной системы, подчиняющейся кинетике Михаэлиса-Ментен.

взаимодействие ферментного белка с субстратом. Уже давно чисто интуитивно принималось, что столь сильные и специфичные взаимодействия не могут происходить во многих различных участках одной и той же полипептидной цепи, в частности потому, что различные ферменты (различные полипептиды) проявляют высокую специфичность по отношению к субстратам с разной стереохимической конфигурацией. Это казалось веским доводом в пользу того, что активные центры немногочисленны и представляют собой особые участки большой полипептидной цепи.

Следует отметить, что в уравнении (1.6) число активных центров ( $E_0$ ) нельзя определить независимо от

результаты  
для  
на  
тот факт.  
факторах  
природы.  
тивного  
функцию  
сравнимы  
личные ф  
торы) эф  
ность при  
с концент

Скорость  
са в прод

В тех  
ная конце  
скую конс  
комплекса  
скорости  
рата

Следует от  
обратной в  
лом оборот  
субстрата,  
центром ф  
пичные для

1. Более  
тогда дано в  
ред.



константы скорости ( $k_p$ ) химической реакции. Скорость реакции при предельно высокой концентрации субстрата равняется  $k_p E_0$ . Еще долгое время после того, как было выведено уравнение (1.6), число активных центров, приходящееся на молекулу, не было известно ни для одного из ферментов. Однако в некоторых частных случаях было очевидно, что число таких центров на молекулу белка невелико. Об этом свидетельствовал тот факт, что различные ферменты, нуждающиеся в кофакторах (низкомолекулярных веществах небелковой природы, необходимых для некоторых типов ферментативного катализа), могут полностью осуществлять свою функцию при очень низких концентрациях кофактора, сравнимых с концентрацией фермента; кроме того, различные ферментные «яды» (т. е. необратимые ингибиторы) эффективно подавляют каталитическую активность при концентрациях, стехиометрически сравнимых с концентрацией белковых молекул фермента.

*Скорость превращения фермент-субстратного комплекса в продукты необычайно высока.*

В тех случаях, когда может быть определена истинная концентрация активных центров ( $E_0$ ), кинетическую константу скорости распада фермент-субстратного комплекса  $k_p$  можно рассчитать, исходя из предельной скорости реакции при высоких концентрациях субстрата

$$-\left(\frac{d[S]}{dt}\right)_{[S] \rightarrow \infty} \longrightarrow k_p E_0.$$

Следует отметить что  $k_p$  имеет размерность величины, обратной времени. Этот параметр часто называют *числом оборотов*<sup>1</sup>, так как он указывает число молекул субстрата, превращаемых в продукт одним активным центром фермента в единицу времени. Некоторые типичные для ферментов числа оборотов приведены ниже:

<sup>1</sup> Более строгое определение кинетических параметров ферментов дано в кн. «Номенклатура ферментов», ВИННИТИ, М., 1966 — Прим. ред.



Фермент	Число оборотов, сек <sup>-1</sup>
Ацетилхолинэстераза . . . . .	10 <sup>3</sup>
Химотрипсин . . . . .	10 <sup>2</sup> (до 10 <sup>3</sup> )
Трипсин . . . . .	10 <sup>2</sup> (до 10 <sup>3</sup> )
Рибонуклеаза . . . . .	10 <sup>2</sup>
Папаин . . . . .	10
Карбоксипептидаза . . . . .	10 <sup>2</sup>
Миозин-АТФ-аза . . . . .	10 <sup>2</sup>
Киназы . . . . .	10 <sup>3</sup>
Уреаза . . . . .	10 <sup>4</sup>
Фумараза . . . . .	10 <sup>3</sup>
Альдолаза . . . . .	10 <sup>2</sup>
Енолаза . . . . .	10 <sup>2</sup>
Карбоангидраза . . . . .	10 <sup>4</sup> (до 10 <sup>5</sup> )
Трансаминазы . . . . .	10 <sup>3</sup>
Дегидрогеназы . . . . .	10 <sup>3</sup>
Каталаза . . . . .	10 <sup>7</sup>
Пероксидаза . . . . .	10

Обращает на себя внимание необычайно большая величина этих чисел, а также относительно узкий диапазон их колебаний.

### 3. ДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ: ПРОШЛЫЕ, НАСТОЯЩИЕ И БУДУЩИЕ ПРОБЛЕМЫ

Следует отметить, что гипотеза об участии «жизненной силы» в действии ферментов занимала господствующее положение в течение всего XIX в. Уникальность биохимических реакций не могла получить рационального объяснения на основе существовавших тогда физических и химических теорий. Теории «жизненной силы» придерживался даже такой выдающийся микробиолог и биохимик, как Луи Пастер. Сторонники *витализма* подчеркивали уникальность биологических процессов — факт, мимо которого могли бы пройти физики и химики того времени. В наше время, однако, физические и химические теории позволяют глубже проникнуть в природу *биологической специфичности*. Поэтому в следующей главе мы рассмотрим силы взаимодействия между атомами и молекулами, имеющие отношение как к образованию фермент-субстратного комплекса, так и к механизмам катализируемых ферментами реакций.

Почему не  
лавирует  
химические  
Какие вл  
ствия не  
фермента  
части молеку

Mahler H. R.  
Row, New  
биологичес  
Fruton J. S.  
Wiley, New  
Segal H. L., Th  
2nd ed., Vo  
Anfinsen C  
York, 1960.  
И.Л. М., 19  
Watson J. D.,  
1965. (Дж.  
«Мир», М.,



Проблемы, стоящие перед современными исследователями ферментов, могут быть сформулированы следующим образом:

Какова конформация и детальная конфигурация химических связей в активном центре фермента?

Почему именно эти специфические структуры обуславливают поразительно быстрые и стереоспецифические химические реакции?

Какое влияние оказывает на механизм взаимодействия небольших молекул субстрата с активным центром фермента структура остальной, значительно большей части молекулы фермента?

#### ЛИТЕРАТУРА

- Mahler H. R., Cordes E. H., Biological Chemistry, Harper and Row, New York, 1966. (Г. Малер, Ю. Кордес, Основы биологической химии, изд-во «Мир», М., 1970.)
- Fruton J. S., Simmonds S., General Biochemistry, 2nd ed., Wiley, New York, 1963.
- Segal H. L., The Development of Enzyme Kinetics, in The Enzymes, 2nd ed., Vol. I, Academic Press, New York, 1959.
- Anfinsen C. B., The Molecular Basis of Evolution, Wiley, New York, 1960. (С. Анфинсен, Молекулярные основы эволюции, ИЛ, М., 1962.)
- Watson J. D., Molecular Biology of the Gene, Benjamin, New York, 1965. (Дж. Уотсон, Молекулярная биология гена, изд-во «Мир», М., 1967.)



## ГЛАВА II

### ФИЗИЧЕСКИЕ СИЛЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ АТОМАМИ И МОЛЕКУЛАМИ

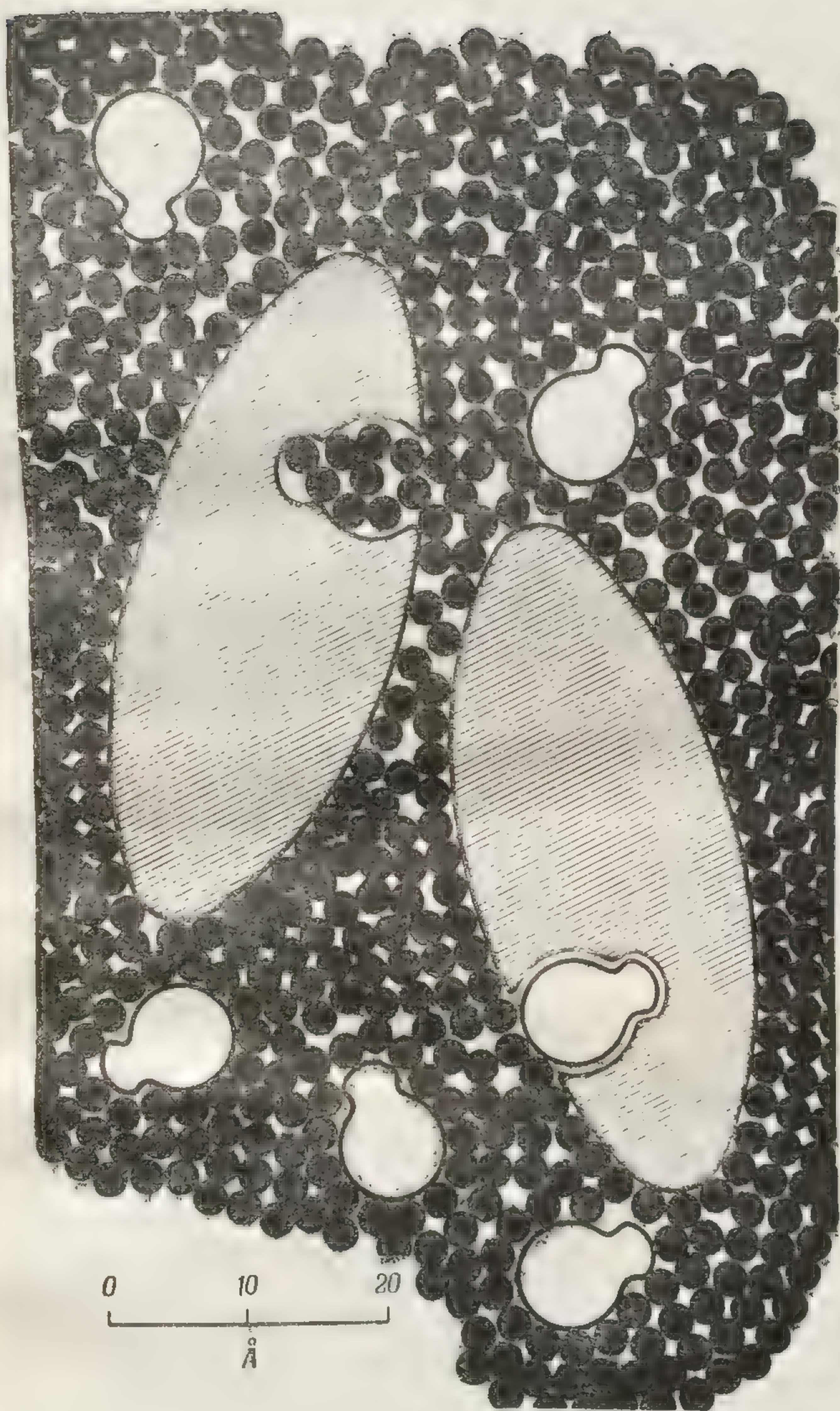
Для того чтобы понять природу необычайно высокого сродства активных центров ферментов к соответствующему субстрату и то, каким образом это специфическое взаимодействие приводит в конечном счете к быстрому катализу, мы кратко остановимся на природе сил взаимодействия между атомами и молекулами. Последующее изложение не претендует на исчерпывающую полноту; мы имели в виду лишь краткое описание тех сил, которые играют важную роль в специфическом взаимодействии фермента и субстрата. Эти силы могут быть разделены (несколько условно) на две категории в зависимости от межатомных расстояний, на которых они становятся достаточными для того, чтобы вносить существенный вклад в общее межмолекулярное взаимодействие.

Взаимодействие фермента и субстрата можно рассматривать, выбрав в качестве примера двухфазную систему (фиг. 6); такая система включает в себя *фазу водного раствора*, в которой молекулы субстрата находятся в среднем на очень большом расстоянии (по сравнению с атомными размерами) друг от друга, и *фазу активных центров*, в которой молекула субстрата и некоторые атомы белковой молекулы фермента находятся очень близко (если также исходить из атомных размеров).

В фазе водного раствора взаимодействия ограничиваются в основном взаимодействиями типа субстрат — растворитель и растворитель — растворитель. Взаимодействия типа субстрат — растворитель относятся обычно только к одной из двух упомянутых выше категорий межмолекулярных взаимодействий. Мы будем

Фиг. 6. Схема, поясняющая взаимодействие субстрата с активными центрами фермента.





Ф и г. 6. Схема, показывающая относительные размеры фермента, активного центра, субстрата и растворителя (вода). Соседние молекулы воды разделены расстоянием примерно 2 Å.



называть их *физическими взаимодействиями*. Молекулы субстрата и растворителя взаимодействуют друг с другом на таких расстояниях, которые больше средней длины химической связи между ковалентно связанными атомами субстрата, но значительно меньше среднего расстояния между двумя молекулами субстрата в разбавленном растворе.

В фазе активных центров во взаимодействие субстрата и фермента вносят свой вклад также и эти физические силы. Кроме того, для того чтобы могла произойти химическая реакция, необходимы и другие взаимодействия, охватывающие некую совокупность атомов фермента и субстрата, а именно взаимодействия на расстояниях порядка длины химической связи. Подобные взаимодействия на близком расстоянии мы будем называть *химическими взаимодействиями*. Рассмотрим сначала происхождение физических взаимодействий.

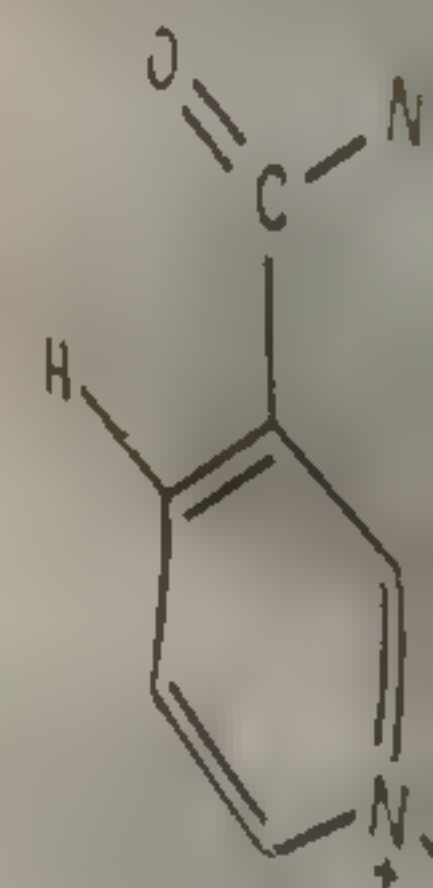
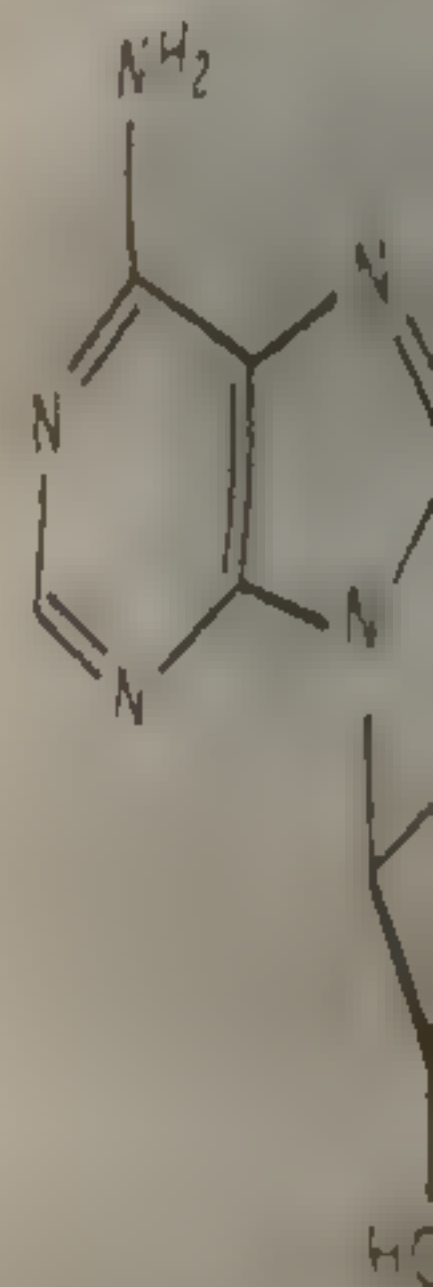
### 1. ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ СИЛЫ

Пожалуй, наиболее знакомой нам физической силой взаимодействия является сила, возникающая между двумя заряженными частицами. Энергия взаимодействия двух точечных зарядов ( $E$ ) как функция расстояния между ними определяется по закону Кулона

$$E = \frac{Z_A Z_B \varepsilon^2}{r_{AB}}, \quad (\text{II. 1})$$

где  $r_{AB}$  — расстояние между частицами А и В,  $Z$  — число единичных зарядов, а  $\varepsilon$  — единичный электрический заряд. Молекулы многих биологических субстратов, в частности тех, которые участвуют в биосинтезе сложных молекул из структурно более простых метаболитов, представляют собой заряженные частицы (ионы). Белки (ферменты) также содержат ряд заряженных аминокислотных компонентов (фиг. 7).

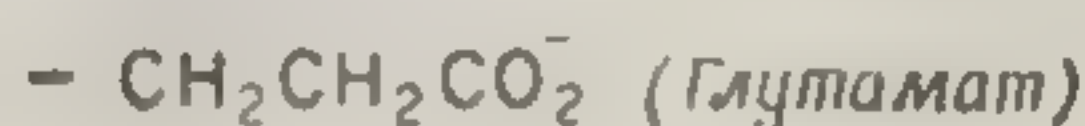
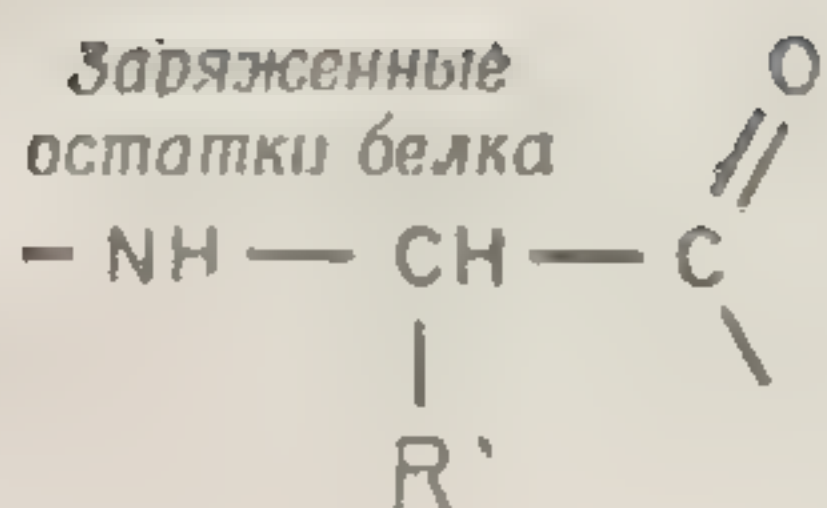
Очевидно, что эти сложные органические ионы, как и более простые неорганические компоненты фермент-субстратных систем (например,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$  и  $\text{NH}_4^+$ ), не представляют собой точечных



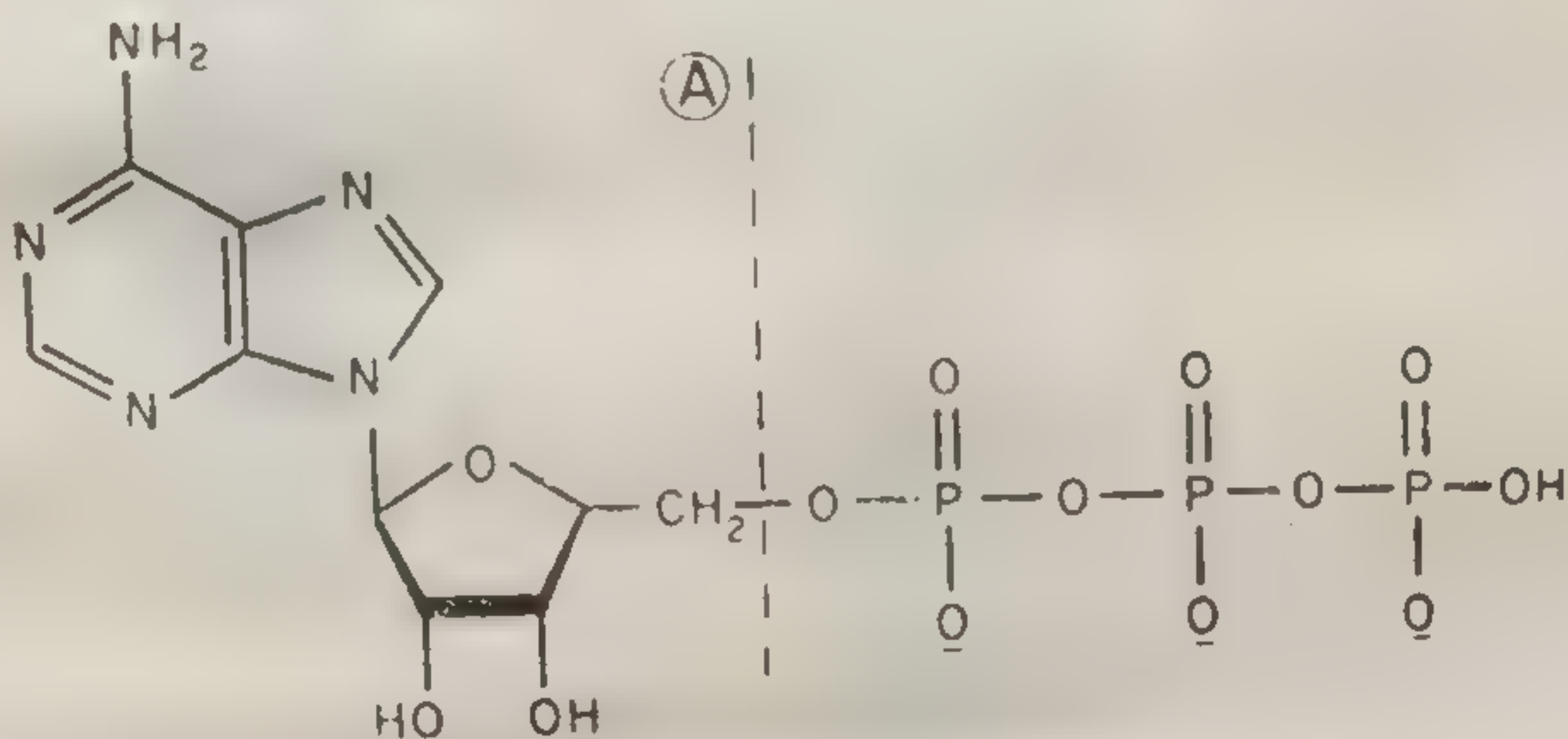
Никотинамид

Фиг. 7. Примеры

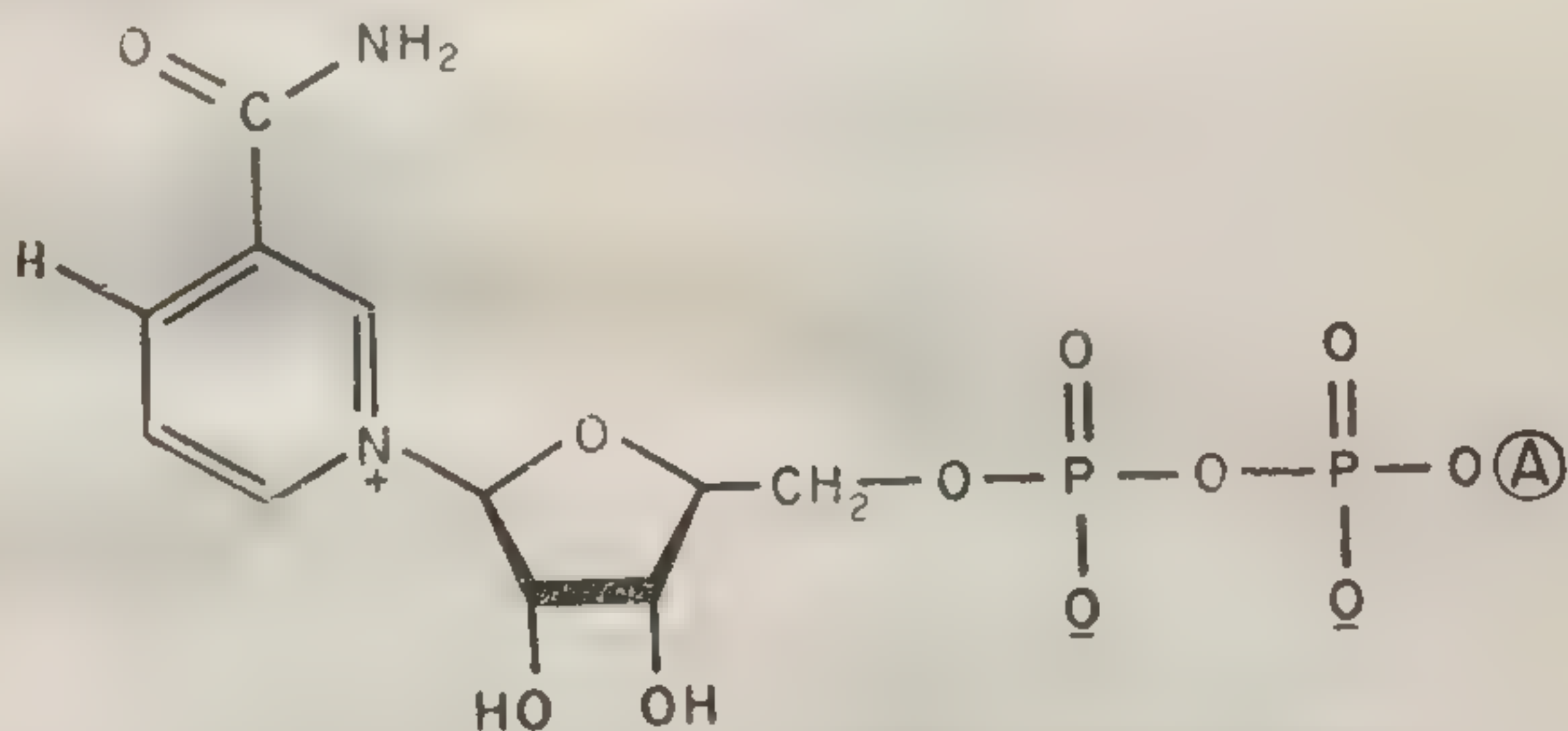




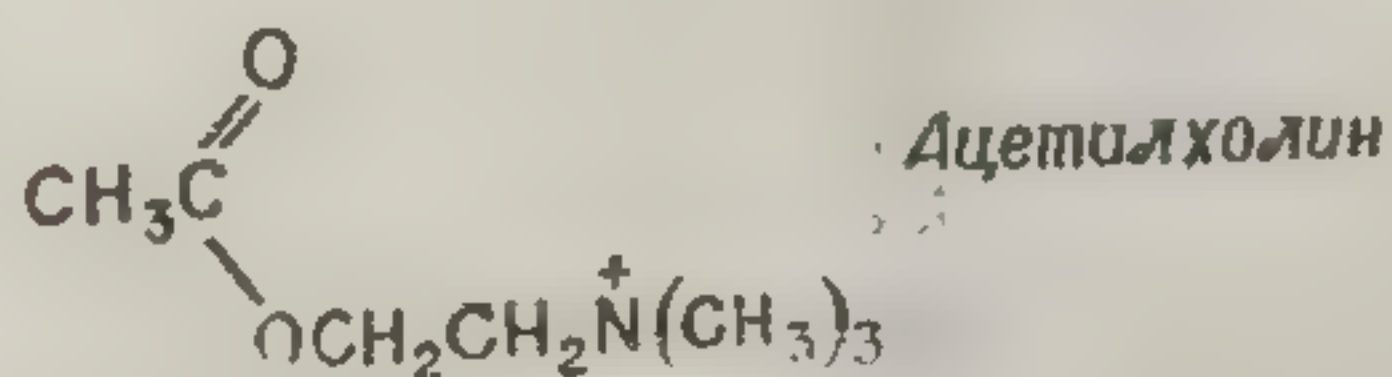
Заряженные группы  
в субстратах



Аденозин-5'-трифосфат (АТФ)



Никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)



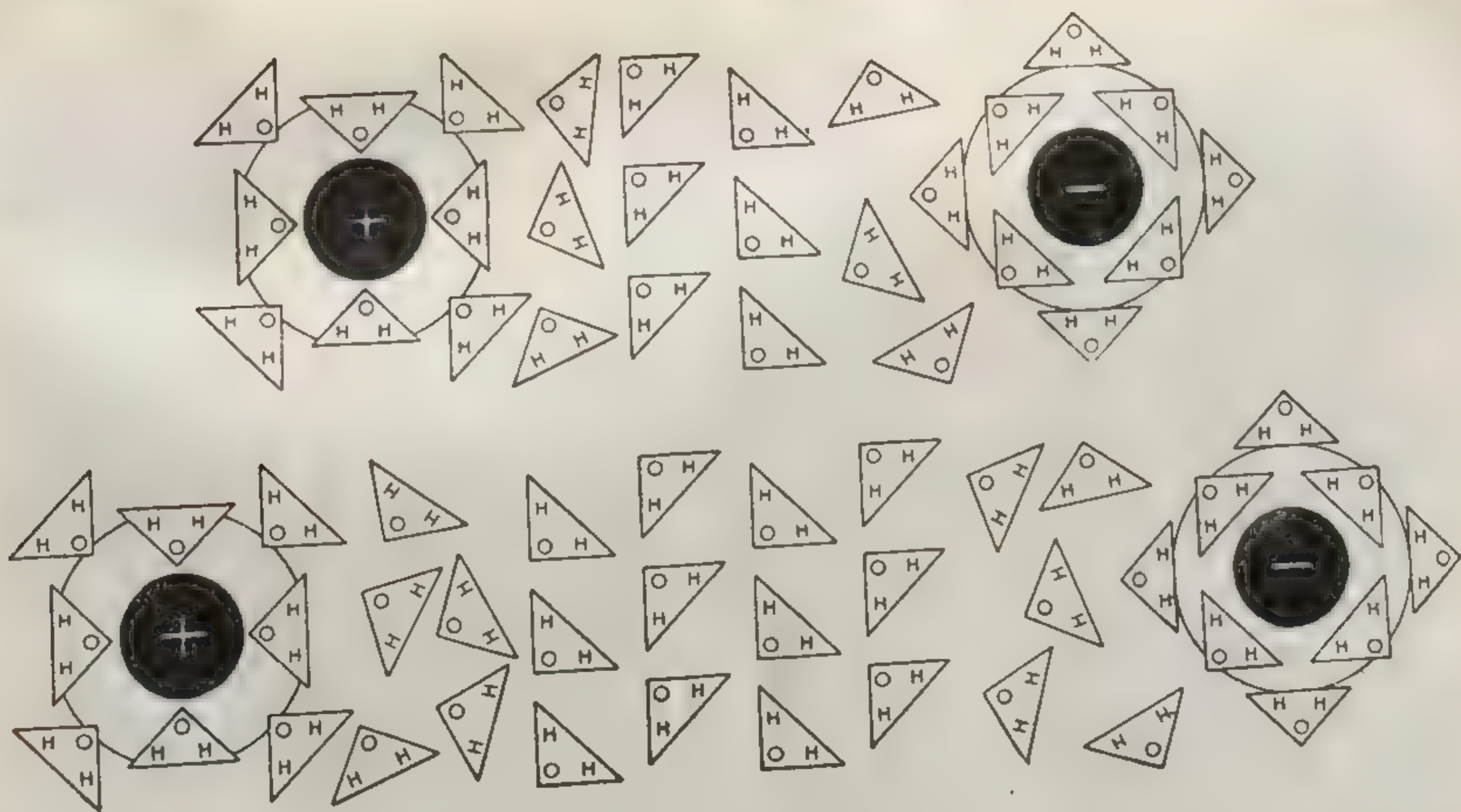
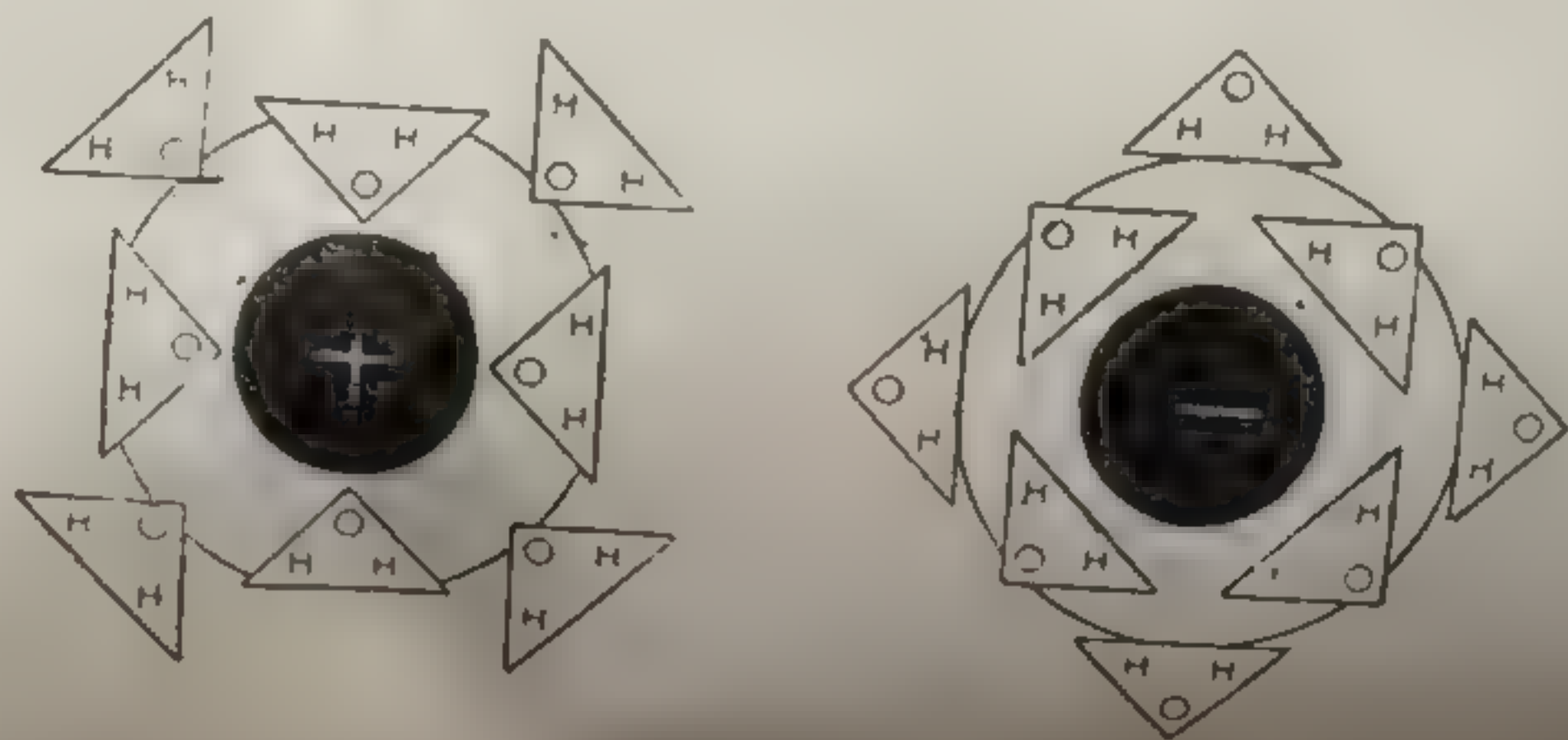
Ацетилхолин

Фиг. 7. Примеры заряженных остатков в молекулах белков и заряженных групп в молекулах субстратов.



Фиг. 8. Схема поясняющая изменение характера водной среды, разделяющей два иона, с изменением расстояния между зарядами.

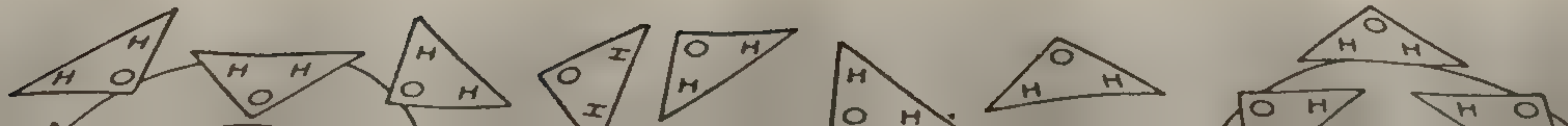
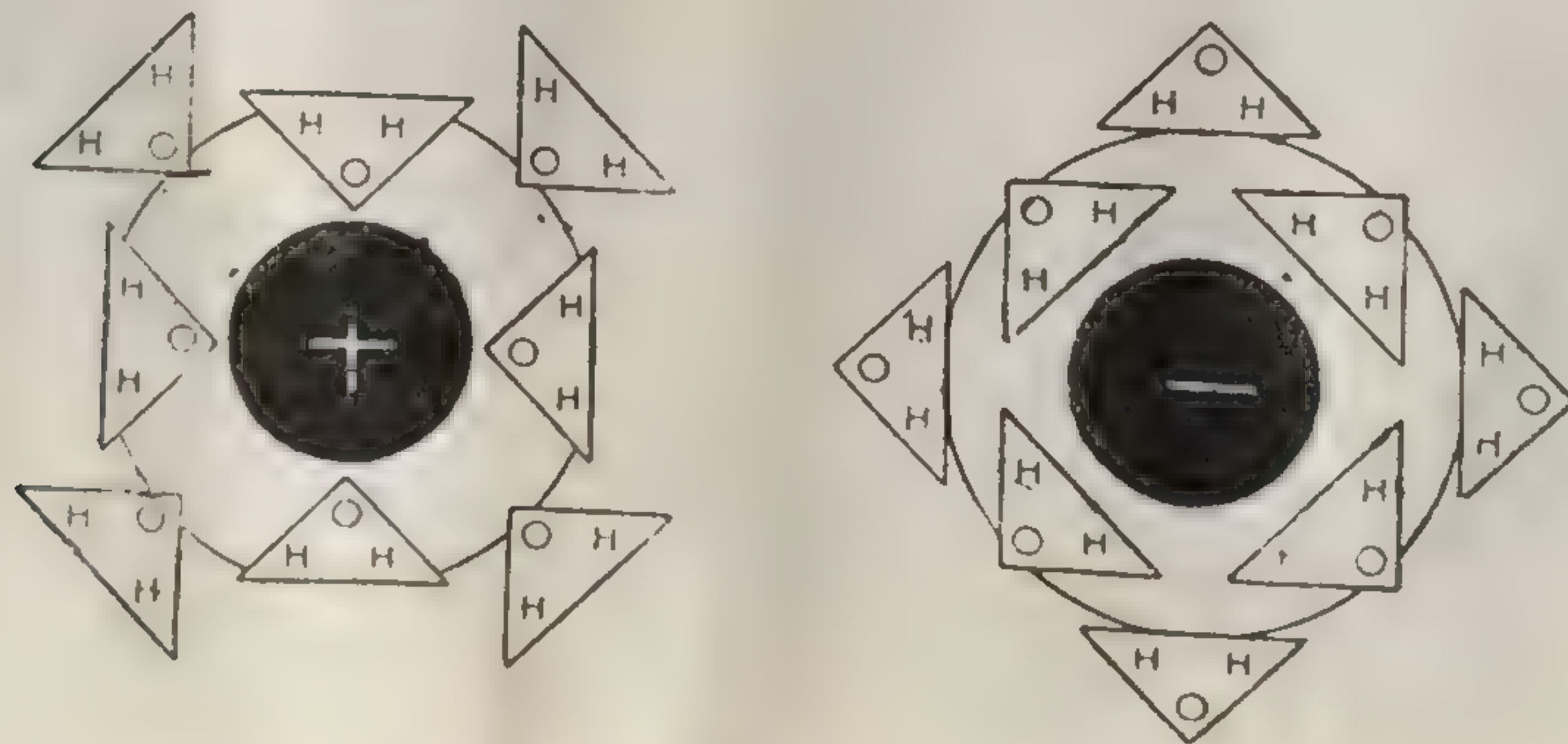
По мере сближения ионов находящийся между ними растворитель становится все более ориентированным и, следовательно, менее поляризуемым. В результате *эффективная диэлектрическая проницаемость* уменьшается и энергия взаимодействия зарядов увеличивается по сравнению с тем, чего следовало бы ожидать, если бы полярные молекулы воды были дезориентированы в той же мере, как обычно.



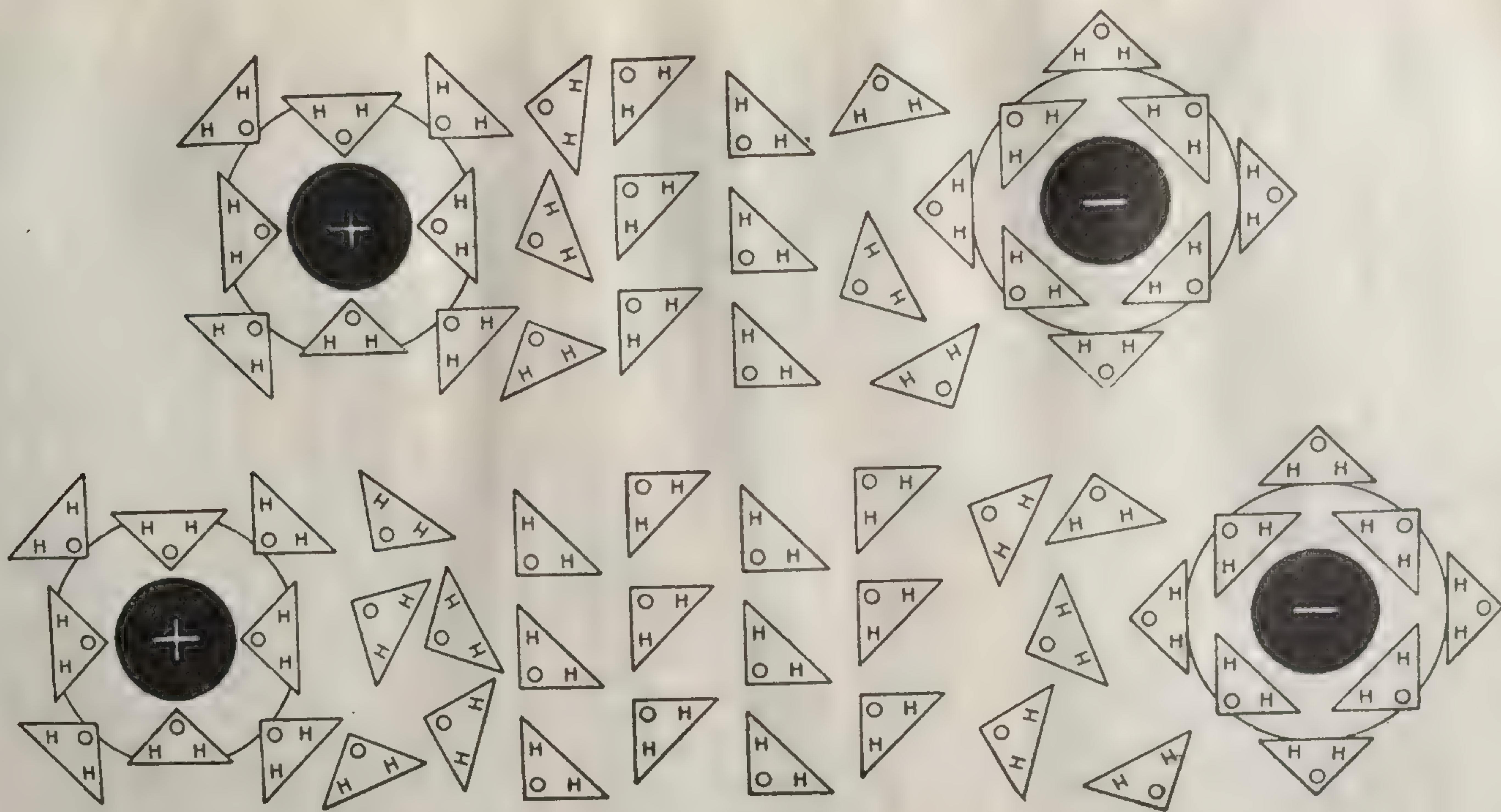


Фиг. 8. Схема, поясняющая изменение характера водной среды, разделяющей два иона, с изменением расстояния между зарядами.

По мере сближения ионов находящийся между ними растворитель становится все более ориентированным и, следовательно, менее поляризуемым. В результате *эффективная диэлектрическая проницаемость* уменьшается и энергия взаимодействия зарядов увеличивается по сравнению с тем, чего следовало бы ожидать, если бы полярные молекулы воды были дезориентированы в той же мере, как обычно.













ходит отражение в диэлектрической проницаемости воды. Ионы очень сильно взаимодействуют с водной средой, в результате чего энергия взаимодействия с другими близко расположенными ионами уменьшается. По мере сближения двух ионов объем растворителя между ними становится менее поляризуемым, чем основная масса растворителя (и, следовательно,  $D$  становится меньше). С уменьшением расстояния между ионами энергия их электростатического взаимодействия увеличивается не прямо пропорционально  $1/r$  [как этого следует ожидать в соответствии с уравнением (II.2)], а быстрее. Двух примеров достаточно, чтобы проиллюстрировать эти эффекты.

В табл. 4 приведены константы диссоциации уксусной кислоты в разбавленных растворах с различной диэлектрической проницаемостью.

Таблица 4

Константы диссоциации уксусной кислоты ( $pK_A$ ) и воды ( $pK_W$ ) в смесях вода — диоксан при  $25^\circ$ <sup>1)</sup>

Относительный объем диоксана $\frac{V_{\text{диоксан}}}{V_{\text{общ}}}$ , %	$D$	$pK_A$ $-\lg \left( \frac{a_{H^+} a_{Ac^-}}{a_{HAc}} \right)$	$pK_W$ $-\lg (a_{H^+} a_{OH^-})$
0	79	4,75	14,0
20	61	5,41	14,6
45	38	6,33	15,8
76	18	8,35	17,8
82	9,5	10,16	

<sup>1)</sup> Символ  $a$  обозначает активность ионов.

Молекула уксусной кислоты нейтральна, продукты ее диссоциации — ацетат-ион и протон — несут противоположные заряды. В разбавленном растворе стремление этих противоположно заряженных ионов разделиться зависит от диэлектрической проницаемости растворителя. Изменение электростатической свободной энергии диссоциации в зависимости от диэлектрической



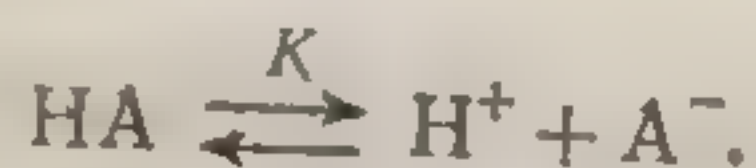
проницаемости растворителя можно выразить, согласно уравнению (II.2), отношением

$$\frac{E_2}{E_1} = \frac{D_1}{D_2}.$$

Как известно из термодинамики равновесных систем, соответствующие различия констант диссоциации кислоты в разных растворителях описываются уравнением

$$\Delta G_{э.л} = E_2 - E_1 = RT \ln \left( \frac{K_2}{K_1} \right), \quad (\text{II.3})$$

где  $K$  — константа диссоциации кислоты в соответствующем растворителе



Следовательно, при снижении диэлектрической проницаемости растворителя будет снижаться и степень диссоциации кислоты. Данные, приведенные в табл. 4, подтверждают это предположение. Также и в нашей модельной системе (фиг. 6), если молекула субстрата заряжена отрицательно а «фаза фермента» — положительно (или наоборот), то вклад электростатической энергии в образование фермент-субстратного комплекса зависит от соотношения диэлектрических проницаемостей растворителя в активном центре и всего объема воды. Хотя трудно определить точное значение этого параметра, тем не менее величина его обычно меньше диэлектрической проницаемости воды, но больше единицы (значение  $D$  в вакууме). Обычно принимают, что значение  $D$  лежит в пределах 10—40. Таким образом, тенденция к ассоциации двух противоположно заряженных ионов будет проявляться в «фазе фермента» сильнее, чем в водной среде.

По данным табл. 5 можно представить себе, что происходит при сближении двух взаимодействующих зарядов. Отчетливо видно влияние электростатического отталкивания зарядов на константу диссоциации кислоты. При этом в результате диссоциации кислоты электростатическое отталкивание двух одноименных зарядов устраняется:



$pK_a(\text{H}_2\text{N}-\text{R})$   
рассчитано

R

$-(\text{CH}_2)_2-$   
 $-(\text{CH}_2)_3-$   
 $-(\text{CH}_2)_4-$   
 $-(\text{CH}_2)_5-$   
 $-(\text{CH}_2)_8-$

1) Внесена поправка  
таблиц рассматриваемых

В качестве хоро-  
пы  $(-\text{CH}_2-)$ ,  
считать как  
«изоляторов» не  
изменять через  
ции другой за-  
вокруг любой с-  
бодное вращени-  
в полностью вы-  
няется, насколько  
талкивание меж-  
По известным  
между ними мо-  
рядами для каж-  
Следовательно, в  
нию электрост-  
в каждой молек-  
одной из заряже-  
внутримолекуляр-  
исчезает, мы мож-  
нию (II.3) своб-  
взаимодействия с-  
ной. Лучше всего  
свободную энерги-  
еия к стандартно-  
хотятся пр-



Таблица 5

$pK_a (H_2N-R-\overset{+}{N}H_3) - pK_a (H_3\overset{+}{N}-R-\overset{+}{N}H_3)$  как функция расстояния  $d$  между заряженными центрами <sup>1)</sup>

R	$d, \text{\AA}$	$\Delta pK_a (H_2O)$	$\Delta pK_a (80\% C_2H_5OH)$
$-(CH_2)_2-$	4,2	2,35	2,76
$-(CH_2)_3-$	5,4	1,43	1,77
$-(CH_2)_4-$	6,6	0,90	1,25
$-(CH_2)_5-$	7,8	0,68	1,05
$-(CH_2)_8-$	11,6	0,27	0,95

<sup>1)</sup> Внесена поправка на статистическую вероятность диссоциации и ассоциации рассматриваемых молекул.

В качестве хорошего приближения метиленовые группы  $(-CH_2-)$ , разделяющие два заряда, можно рассматривать как «изоляторы». Вследствие наличия таких «изоляторов» ни одна из заряженных групп не может изменять *через ковалентные связи* энергию диссоциации другой заряженной группы. Так как в молекуле вокруг любой одинарной связи может происходить свободное вращение, то вероятно, что молекулы находятся в полностью вытянутой конформации, так что устраняется, насколько это возможно, электростатическое отталкивание между одноименно заряженными концами. По известным длинам ковалентных связей и углам между ними можно рассчитать расстояние между зарядами для каждого случая, приведенного в табл. 5. Следовательно, возможно рассчитать свободную энергию электростатического взаимодействия зарядов в каждой молекуле. Принимая, что при диссоциации одной из заряженных групп в разбавленном растворе внутримолекулярное электростатическое отталкивание исчезает, мы можем сравнить вычисленную по уравнению (II.3) свободную энергию электростатического взаимодействия с экспериментально найденной величиной. Лучше всего проводить такое сравнение, отнеся свободную энергию электростатического взаимодействия к стандартному состоянию, в котором заряды находятся практически на бесконечном удалении друг от



друга. Как видно из результатов, представленных в табл. 5, электростатическая свободная энергия взаимодействия возрастает с уменьшением расстояния между зарядами значительно быстрее, чем предсказывается уравнением (II.2), если эти заряды сближаются на расстояние  $10 \text{ \AA}$  или меньше.

Поэтому в фазе активных центров, если фермент и субстрат заряжены, факторы геометрии молекул, ограничивающие расстояние, на которое могут сближаться эти два заряда, жестче определяют энергию, извлекаемую из взаимодействия, чем это предсказывается уравнением (II.2). Подобные геометрические факторы могут вносить свой вклад в наблюдаемую специфичность фермент-субстратных взаимодействий.

На основании сказанного выше можно предположить, что два противоположно заряженных объекта будут стремиться сближаться друг с другом до расстояния, на котором образуется химическая связь. Однако в действительности это не так. По мере сближения двух противоположно заряженных атомов или молекул их заполненные электронные орбитали начинают перекрываться. Это приводит к очень сильному межэлектронному отталкиванию, которое в определенный момент уравновешивает межионное электростатическое притяжение. Расстояние между двумя взаимодействующими ионами, на котором достигается максимальная устойчивость, называют *расстоянием ионного контакта*.

## 2. ДИСПЕРСИОННЫЕ СИЛЫ ЛОНДОНА

Между любыми двумя атомами, в том числе, например, между атомами благородных газов, существуют силы притяжения, происхождение которых удалось объяснить только в рамках современной квантовой теории. Рассмотрим какой-либо атом: для распределения электронного заряда вокруг ядра характерна в среднем сферическая симметрия, т. е. отсутствие постоянного дипольного момента. Однако в *любой момент времени* распределение электронного заряда будет представлять собой некую специфическую асимметрическую конфигурацию, зависящую от распределения

где  $r_{AB}$  — расстояние между атомами  $A_0$  и  $B_0$  — кон-  
структуру атома  
участвующие в  
называются дис-  
Положение м-  
ствует вандерваа-  
ные вандервааль-  
ляющие интерес  
с которыми нам

Н  
СН (тетраэдрический)  
СН (плоский тригона-  
Н  
NH (как в NH)  
O  
S  
P



электронов по различным электронным орбиталям (фиг. 9). В каждый данный момент это вызовет комплементарное распределение электронных зарядов в соседних атомах. Такое индуцированное дипольное взаимодействие приведет к тому, что два любых соседних атома будут притягиваться. Однако, когда два атома подходят очень близко друг к другу, отталкивание между их электронными облаками становится настолько сильным, что в конечном итоге уравнивает индуцированное дипольное притяжение. Расстояние, на котором сила притяжения между двумя атомами максимальна, называется *вандерваальсовым расстоянием контакта*. Это расстояние, характерное для каждой пары взаимодействующих атомов, складывается из *вандерваальсовых радиусов* каждого атома. С хорошим приближением взаимодействие двух инертных в других отношениях атомов может быть описано функцией потенциальной энергии  $W_{AB}$

$$W_{AB} = - \frac{A_0}{r_{AB}^6} + \frac{B_0}{r_{AB}^{12}}, \quad (\text{II. 4})$$

где  $r_{AB}$  — расстояние между центрами двух атомов, а  $A_0$  и  $B_0$  — константы характеризующие электронную структуру атомов. Силы притяжения и отталкивания, участвующие в этом взаимодействии, в совокупности называются *дисперсионными силами Лондона*.

Положение минимума энергии на фиг. 9, Б соответствует вандерваальсову расстоянию контакта. Типичные вандерваальсовы радиусы атомов  $r_{AA}/2$ , представляющие интерес с точки зрения биологических систем, с которыми нам придется иметь дело, приведены ниже:

Атом	$r$ , Å
H . . . . .	1,2
CH (тетраэдрический, как в метане) . . . . .	2,0
CH (плоский тригональный, как в бензоле) . . . . .	1,8
N . . . . .	1,5
NH (как в $\text{NH}_3$ ) . . . . .	2,1
O . . . . .	1,4
S . . . . .	1,85
P . . . . .	1,9







Следует отметить, что суммы этих радиусов намного больше, чем длины ковалентных связей. Для того чтобы между атомами образовалась ковалентная связь, они должны сблизиться на расстояние, значительно меньшее, чем вандерваальсово расстояние контакта, однако этому препятствует отталкивание их электронных оболочек; поэтому образование ковалентной связи всегда сопровождается затратой большого количества энергии, которая и расходуется на преодоление этих сил отталкивания. Из вида функции потенциальной энергии, приведенной выше [уравнение (II.4)], а также из фиг. 9, Б можно заключить, что энергия взаимодействия подобного типа чрезвычайно сильно зависит от расстояния, на котором находятся два взаимодействующих атома. Отсюда следует, что в фазе активных центров способность группы атомов сблизиться до вандерваальсова расстояния контакта будет очень жестко определять энергию, выигрываемую при таком взаимодействии. Если многие атомы субстрата могут сблизиться до расстояния контакта со многими атомами фермента, то энергия такого взаимодействия будет большой, так как общий выигрыш энергии, грубо говоря, равен сумме энергий попарно взаимодействующих атомов. Для того чтобы возникла такая ситуация, должна существовать «комплементарность» геометрических структур фермента и субстрата. Именно этот тип взаимодействий порождает в значительной мере

---

ческое взаимодействие. Б. Приближенное уравнение, впервые выведенное Лондоном, определяет общую энергию притяжения  $W$  двух взаимно индуцированных атомов (А и В) в виде

$$W_{\text{притяж}} \approx \frac{\alpha_A \alpha_B}{r_{AB}^6} \cdot \frac{I_A I_B}{(I_A + I_B)},$$

где  $\alpha$  — поляризуемость электронных оболочек каждого атома. Для атомов, наиболее распространенных в биологических системах (С, Н, О, N), величина  $\alpha$  приблизительно пропорциональна атомному номеру элемента, а  $I$  для атомов второго периода периодической системы — почти постоянная величина.

Когда электронные орбитали двух атомов сближаются слишком сильно, отталкивание электронов начинает противостоять притяжению индуцированных диполей. По уравнению (II.4) можно рассчитать общую энергию системы, сообщаемую ей силами отталкивания и притяжения. Приведенная кривая изображает энергию взаимодействия как функцию расстояния между двумя атомами.



биологическую специфичность ферментов по отношению к субстратам с определенной геометрией молекулы.

### 3. ДИПОЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Промежуточное положение между ионными и лондоновскими силами, которые мы уже рассмотрели выше, занимают межмолекулярные силы, возникающие в результате взаимодействия полярных молекул; таковы, например, взаимодействия иона и полярной молекулы, диполя и индуцированного диполя, иона и индуцированного диполя, диполя и диполя и т. д. В этом случае вид функции, выражающей зависимость энергии взаимодействия от расстояния, на котором находятся взаимодействующие частицы, носит промежуточный характер между аналогичными зависимостями для чисто ионного типа взаимодействия ( $E$  пропорционально  $r_{AB}^{-1}$ ) и для чисто дисперсионного ( $E$  пропорционально  $r_{AB}^{-6}$ ). Хотя эти физические взаимодействия промежуточного типа, несомненно, важны во многих случаях фермент-субстратных взаимодействий, их относительное значение варьирует от случая к случаю, причем по большей части их суммарный вклад в общую энергию взаимодействия мал по сравнению с вкладом двух вышеупомянутых сил.

### 4. ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ

Для инертных жидкостей мерой лондоновской дисперсионной энергии является теплота парообразования, так как в этом случае процесс сжижения обусловлен в основном дисперсионными взаимодействиями. С увеличением числа углеродных атомов в молекуле теплота парообразования инертных углеводородов (табл. 6) увеличивается на почти постоянную величину.

Исходя из данных, полученных для жидких углеводородов, можно было бы попытаться предсказать теплоты парообразования и точки кипения некоторых других широко распространенных жидкостей в предположении, что их жидкое агрегатное состояние зависит исключительно от дисперсионных сил. В таком случае

Физические свойства  
Теплоты парообразования  
Соединения

Соединения	Теплота парообразования, ккал/моль
CH <sub>4</sub>	16
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	3
н-С <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	44
н-С <sub>4</sub> H <sub>10</sub>	55
Бензол	17
NH <sub>3</sub>	32
CH <sub>3</sub> OH	45
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	13
H <sub>2</sub> O	

<sup>1</sup>  $\Delta H_{\text{дисп}}$  принято равным  
(рассчитывается путем интерполяции в таблицу).

следовало бы ожидать  
зобразном состоянии  
воздуха и что металлы  
при комнатной температу  
ности это не так, пр  
каких-то других сил  
мине и других жидкост  
ми кипения (и высокотем  
образования) устойчи  
лена главным образом  
быть классифицированы  
физическим и химическим  
атомами кислорода в  
альсового расстояния  
мической связи. Прич  
связей между атомами  
Некоторые данные  
типов водородных связей  
<sup>1</sup> Среднее расстояние  
тат, исходя из плотности  
1 моль, или 602 · 10<sup>23</sup> молекул  
одну молекулу, равен 2,6  
стояние между молекулами  
2,6 А.



Таблица 6

Теплоты парообразования (ккал/моль) при нормальных условиях <sup>1)</sup>

Соединение	Мол. вес	$\Delta H_v$	$T_{\text{кип}}, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_v/\text{Мол. вес}$	$\Delta H_v - \Delta H_{\text{дисп}}$
$\text{CH}_4$	16	2,0	-162	0,125	
$\text{C}_2\text{H}_6$	30	3,5	-89	0,12	
$\text{n-C}_3\text{H}_8$	44	4,5	-42	0,10	
$\text{n-C}_4\text{H}_{10}$	58	5,4	-0,5	0,09	
Бензол	78	7,6	80	0,10	
$\text{NH}_3$	17	5,6	-33	0,33	3,5
$\text{CH}_3\text{OH}$	32	8,4	65	0,26	4,7
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	46	9,4	78	0,20	4,7
$\text{H}_2\text{O}$	18	8,7	100	0,48	6,5

<sup>1)</sup>  $\Delta H_{\text{дисп}}$  принято равным  $\Delta H_v$  углеводорода с тем же молекулярным весом (рассчитывается путем интерполяции из величин, приведенных в верхней части таблицы).

следовало бы ожидать, что вода будет находиться в газообразном состоянии даже при температуре жидкого воздуха и что метанол и этанол будут газообразными при комнатной температуре. Поскольку в действительности это не так, приходится допустить действие еще и каких-то других сил. В этаноле, метаноле, воде, аммиаке и других жидкостях с необычно высокими точками кипения (и высокими значениями энтальпии парообразования) устойчивость жидкой структуры обусловлена главным образом взаимодействием, которое может быть классифицировано как промежуточное между физическим и химическим. Среднее расстояние между атомами кислорода в жидкой воде меньше вандерваальсового расстояния контакта<sup>1</sup>, но больше длины химической связи. Причина этого в наличии *водородных связей* между атомами кислорода.

Некоторые данные относительно встречающихся типов водородных связей приведены в табл. 7. При

<sup>1</sup> Среднее расстояние между молекулами воды можно рассчитать, исходя из плотности воды. При 4°C 16 мл воды содержат 1 моль, или  $6,02 \cdot 10^{23}$  молекул. Средний объем, приходящийся на одну молекулу, равен  $2,66 \cdot 10^{-23}$  мл, или  $26,6 \text{ \AA}^3$ , а среднее расстояние между молекулами воды составляет  $26,6^{1/3} \cdot 10^{-8}$  см, или 2,98 Å.



образовании водородных связей существенное значение имеет природа «донорных» и «акцепторных» атомов. В фермент-субстратных системах только атомы кислорода и азота (возможно, также и серы) участвуют в образовании водородных связей. Хорошими донорами водородной связи могут служить группы типа  $-\text{OH}$  и  $-\text{NH}$ . Акцепторами могут служить атомы кислорода карбонильной и гидроксильной групп, а также (правда, в меньшей степени) азотистые основания (например, имидазол). Типичные значения энергии таких водородных связей лежат в пределах 3—6 ккал/моль. Эти величины кажутся довольно значительными, но не следует забывать, что интересующие нас процессы происходят в водных системах: образование водородной связи между молекулой субстрата и каким-либо участком фермента может дать существенный выигрыш в энергии, однако этот выигрыш может быть уравновешен в силу способности молекул донора и акцептора образовывать водородные связи с водой.

Таблица 7

Длины типичных водородных связей

Тип связи	Типичные соединения	Расстояние, Å $\text{X}-\text{H} \cdots \text{Y}$ $\longleftrightarrow d \longleftrightarrow$
$\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}$	Вода ..	2,8
$\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}$	Первичные спирты	2,7
$\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}$	Карбоновые кислоты	2,6
$\text{N}-\text{H} \cdots \text{N}$	Аммиак, амины	3,1
$\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}$	Мочевина, амиды, пептиды	2,9

Чтобы лучше оценить общий выигрыш в энергии в результате образования водородных связей, мы должны рассматривать процесс следующим образом. Молекула субстрата в водной фазе разрывает часть водородных связей, существующих в воде. В зависимости от своего химического строения и геометрии она может разрывать одну или несколько водородных связей в структуре жидкой воды. При перемещении этой молекулы субстрата из водной фазы в фазу активных центров восстанавливается максимальное число водородных

связей. Акцепторы центров образуют и ферменты. Воды из водородных связей, получаемая, собой аллелодных связей. индивидуальном значительном водородных связей. чае, когда мы текущий изол. такое взаимодей. ятным вследствие водородных связей

## 5. СТРУКТУРА В

Структура жидкой воды. Водородными связями и ионами существуют высокие вследствие высокой растворен фермент — дела фермент — ной и некоторые молекулами воды. реального в воде, которой доноры, шиеся в молекулах водородных связей. Энергетическая структура молекулы, что обеспечивает. Таким образом, высокая роль, определяющая фермент. Как будет происходить стр



связей, характерное для чистой воды. В фазе активных центров образование водородной связи между субстратом и ферментом может привести к вытеснению молекул воды из этой фазы в водную фазу (где число водородных связей близко к максимальному). *Общая энергия*, получаемая в результате этого процесса, представляет собой алгебраическую сумму энергий всех водородных связей, разрываемых и образуемых в каждом индивидуальном процессе. Эта общая энергия в среднем значительно меньше, чем энергия образования водородных связей между ферментом и субстратом в случае, когда мы рассматриваем этот процесс как протекающий изолированно, в отсутствие воды. Однако такое взаимодействие все же можно считать благоприятным вследствие высокой эффективности образования водородных связей в жидкой воде.

#### 5. СТРУКТУРА ВОДЫ В СВЯЗИ СО СТРУКТУРОЙ БЕЛКОВ

Структура жидкой воды, сплошь «пронизанной» водородными связями, очень стабильна, а между водой и ионами существует очень сильное взаимодействие вследствие высокой поляризуемости воды. Когда в воде растворен фермент, структура ее на поверхности раздела фермент — вода неизбежно оказывается нарушенной и некоторые водородные связи между соседними молекулами воды утрачиваются. Для белка, растворенного в воде, энергетически выгодна ситуация, при которой доноры и акцепторы водородных связей, имеющиеся в молекуле белка, возмещают по крайней мере часть водородных связей, утраченных в результате нарушения структуры жидкой воды у поверхности раздела. Энергетически выгодно также, чтобы заряды белковой молекулы располагались вблизи этой поверхности, что обеспечивает сильное взаимодействие с растворителем. Такого рода взаимодействия, являющиеся следствием высокополярной природы воды, играют важную роль, определяя конформацию сложной белковой молекулы фермента.

Как будет показано в гл. III, основную роль в определении структуры белка в растворе играют



специфическая последовательность аминокислот и природа полипептидного хребта белковой цепи. Решающее значение этих факторов вытекает из жестких ограничений, накладываемых допустимой длиной химических связей и допустимыми величинами углов между ними. Каким образом эти ограничения определяют трехмерную конформацию сложной белковой молекулы, лучше всего показали основополагающие исследования Полинга, Кори и их сотрудников по природе химических связей в полипептидах. Результаты этих исследований позволили предсказать  $\alpha$ -спиральную структуру<sup>1</sup> полипептидов, рассматриваемую в следующей главе.

## ЛИТЕРАТУРА

- Pauling L., The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed., Cornell University Press, Ithaca, New York, 1960.  
Edsall J. T., Wyman J., Biophysical Chemistry, Academic Press, New York, 1958.  
Watson J. D., Molecular Biology of the Gene, Benjamin, New York, 1965. (Дж. Уотсон, Молекулярная биология гена, изд-во «Мир», М., 1967.)  
Pimentel G. C., McClellan A. L., The Hydrogen Bond, Freeman, San Francisco, 1960. (Дж. Пиментел, О. МакКлеллан, Водородная связь, изд-во «Мир», М., 1964.)  
Pauling L., Pressman D., The Serological Properties of Simple Substances, IX, J. Amer. Chem. Soc., 67, 1003 (1945).

<sup>1</sup> Мы придерживаемся термина  *$\alpha$ -спиральная структура*, прочно вошедшего в литературу на русском языке, хотя более точный перевод английского выражения  *$\alpha$ -helical structure* —  *$\alpha$ -винтовая структура*. — Прим. ред.



## ГЛАВА III

# ХИМИЧЕСКИЕ СВЯЗИ И СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Прежде чем изучать *конформацию* (специфическую трехмерную структуру) высокомолекулярного полипептида или белка, необходимо получить сведения о пространственном расположении атомов, т. е. об *атомной конфигурации*, в молекулах меньшего размера: аминокислотах и пептидах, являющихся компонентами белков. С помощью методов рентгеноструктурного анализа кристаллов можно получить подробные количественные данные об интересующих нас длинах *внутримолекулярных* связей и углах между связями. Геометрические детали регулярного расположения молекул в кристалле (*конформация*) с *необходимостью* определяются в ходе исследования внутримолекулярных параметров, а конформационные параметры указывают на те физические взаимодействия, которые могут иметь место между различными молекулярными остатками в сложном полипептиде. Так, например, по ним можно определить то минимальное расстояние, на которое могут сблизиться два несвязанных атома (вандерваальсово расстояние контакта).

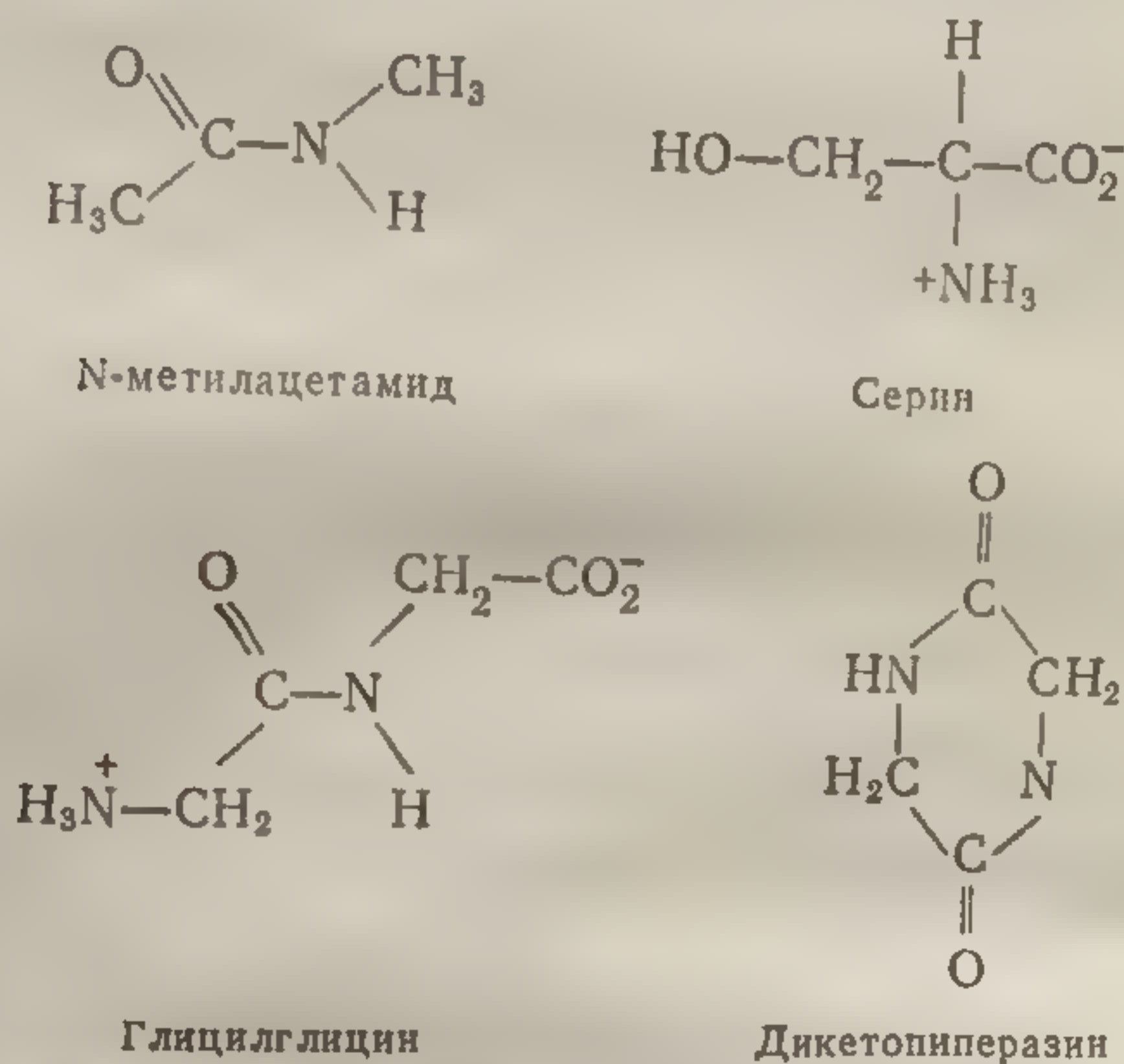
### 1. ХИМИЧЕСКИЕ СВЯЗИ И КОНФИГУРАЦИЯ ПЕПТИДОВ

Занимаясь проблемой конформации пептидов, Полинг, Кори и их сотрудники исследовали трехмерную структуру кристаллов некоторых простых органических молекул. Структурные формулы некоторых изученных ими соединений изображены на фиг. 10.

Полный анализ трехмерной структуры даже таких простых органических молекул дал очень много полезной информации. На фиг. 11—14 приведены атомные



координаты группы молекул L-треонина, достаточные для описания расположения всех атомов в кристалле. Следует отметить, что, хотя в каждой молекуле относительные координаты атомов идентичны, существует несколько различных относительных ориентаций молекул



Фиг. 10. Некоторые типичные органические молекулы, использованные для получения информации о характерных чертах структуры полипептидов.

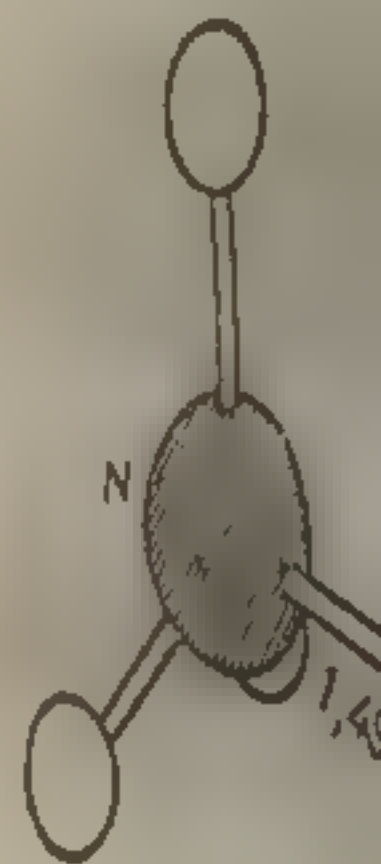
Следует отметить наличие пептидных связей, тетраэдрических α-углеродных атомов, концевых амино- и карбоксильных групп и некоторых типичных боковых цепей, присутствующих в полипептидах и белках.

в кристалле. Для того чтобы описать относительные координаты любой пары атомов, принадлежащих соседним молекулам, необходимо рассматривать совокупность четырех таких молекул. Это наименьшая повторяющаяся структурная единица кристалла, называемая элементарной ячейкой.

В результате накопления большого количества данных, подобных приведенным на фиг. 11—14, а также в табл. 8 и 9, удалось сформулировать следующие вполне определенные выводы:

1) В каждом из изученных пептидов все атомы, входящие в состав пептидной связи, лежат в одной пло-

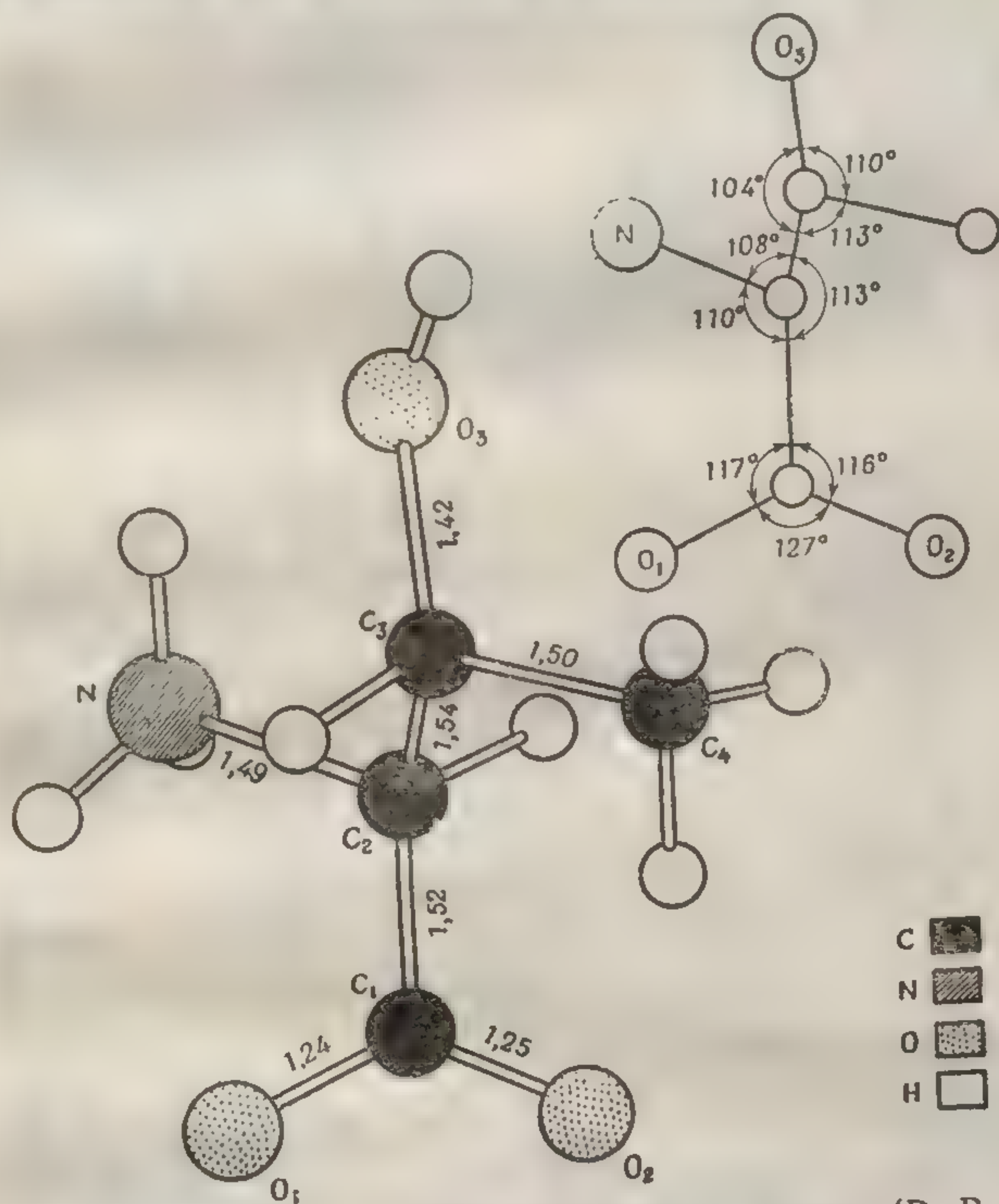
связи 14. 15  
типичной связи  
ду атомом угл  
азота частично



Фиг. 11. Атомные  
maker et  
2) Два α-уг  
связи имеют  
принимать тра  
расстояние ме  
2,8 Å. В тран  
и кислородным  
равно примерн



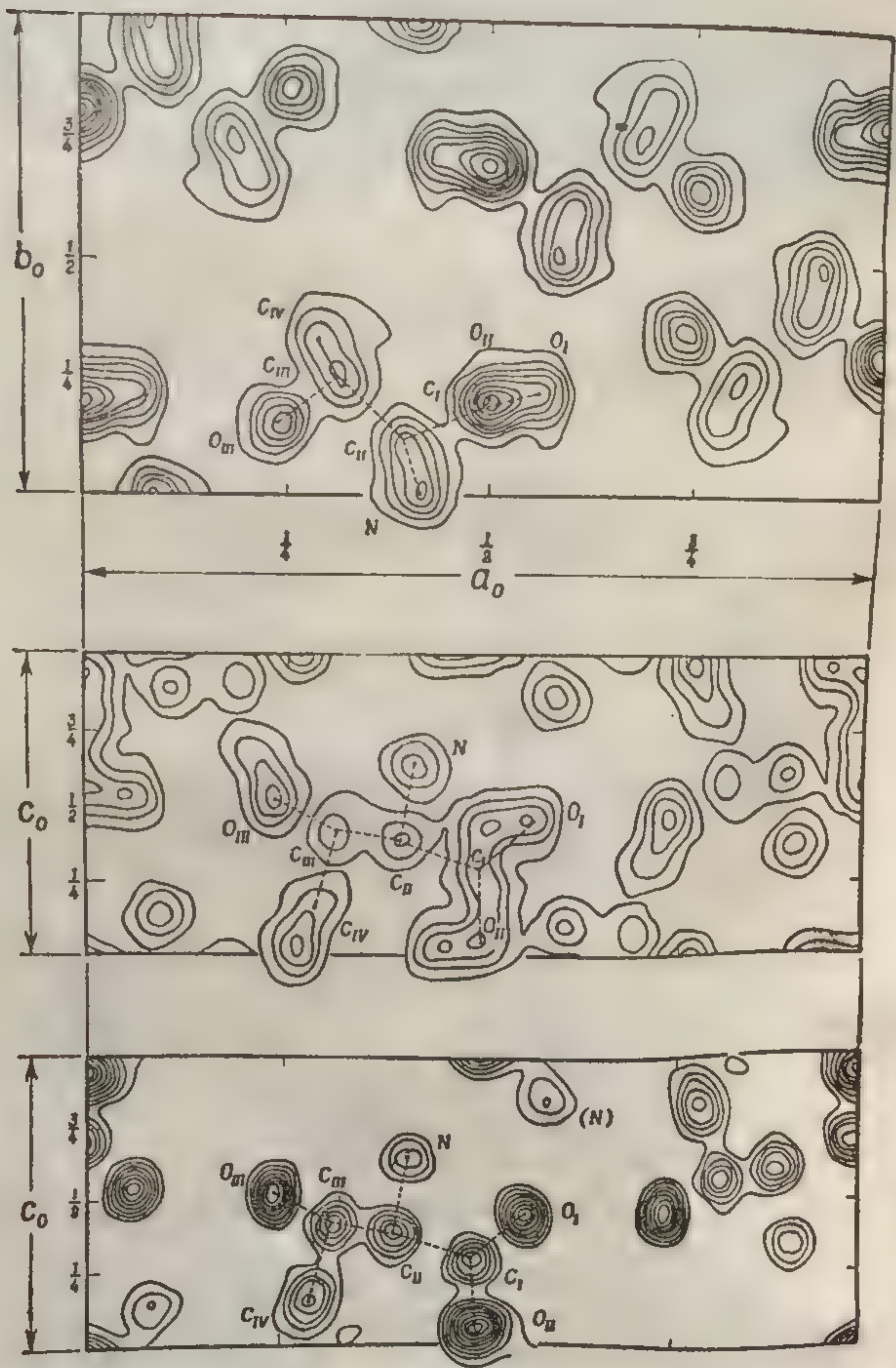
скости (фиг. 15). Эта копланарность всех атомов пептидной связи является следствием того, что связь между атомом углерода карбонильной группы и атомом азота частично имеет характер двойной связи.



Фиг. 11. Атомные координаты в молекуле L-треонина (D. P. Shoemaker et al., J. Am. Chem. Soc., 72, 2343, 1950).

2) Два  $\alpha$ -углеродных атома при каждой пептидной связи имеют транс-конфигурацию. Атомам выгоднее принимать транс-конфигурацию. В цис-конфигурации расстояние между C-1 и C-2 (фиг. 15) составляет 2,8 Å. В транс-конфигурации расстояние между C-1 и кислородным атомом карбонильной группы также равно примерно 2,8 Å, но вандерваальсово расстояние





Фиг. 12. Карты распределения электронной плотности по трем кристаллографическим осям для группы молекул L-треонина.

контакт между  
в виде атомов  
состоит из 34 атомов  
наименьших

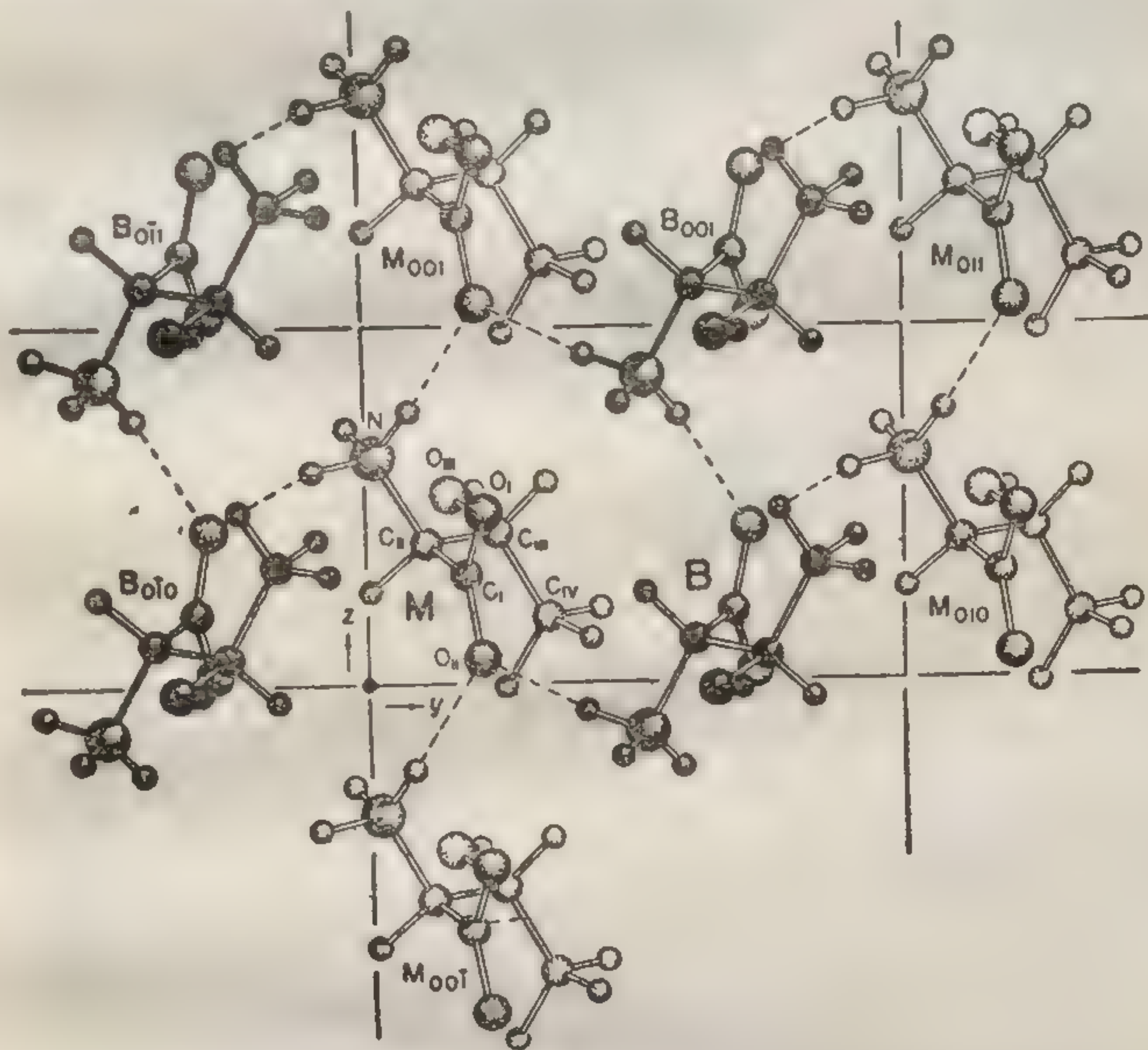


Фиг. 13. Изображение строенное на основании Приведены размеры эл

3) В кристалл  
ное число водород  
содержит один по  
потенциальный ак  
ной группы) водор  
сталлах амидов  
между ковалентно  
азота и кислорода  
ние  
намного ме



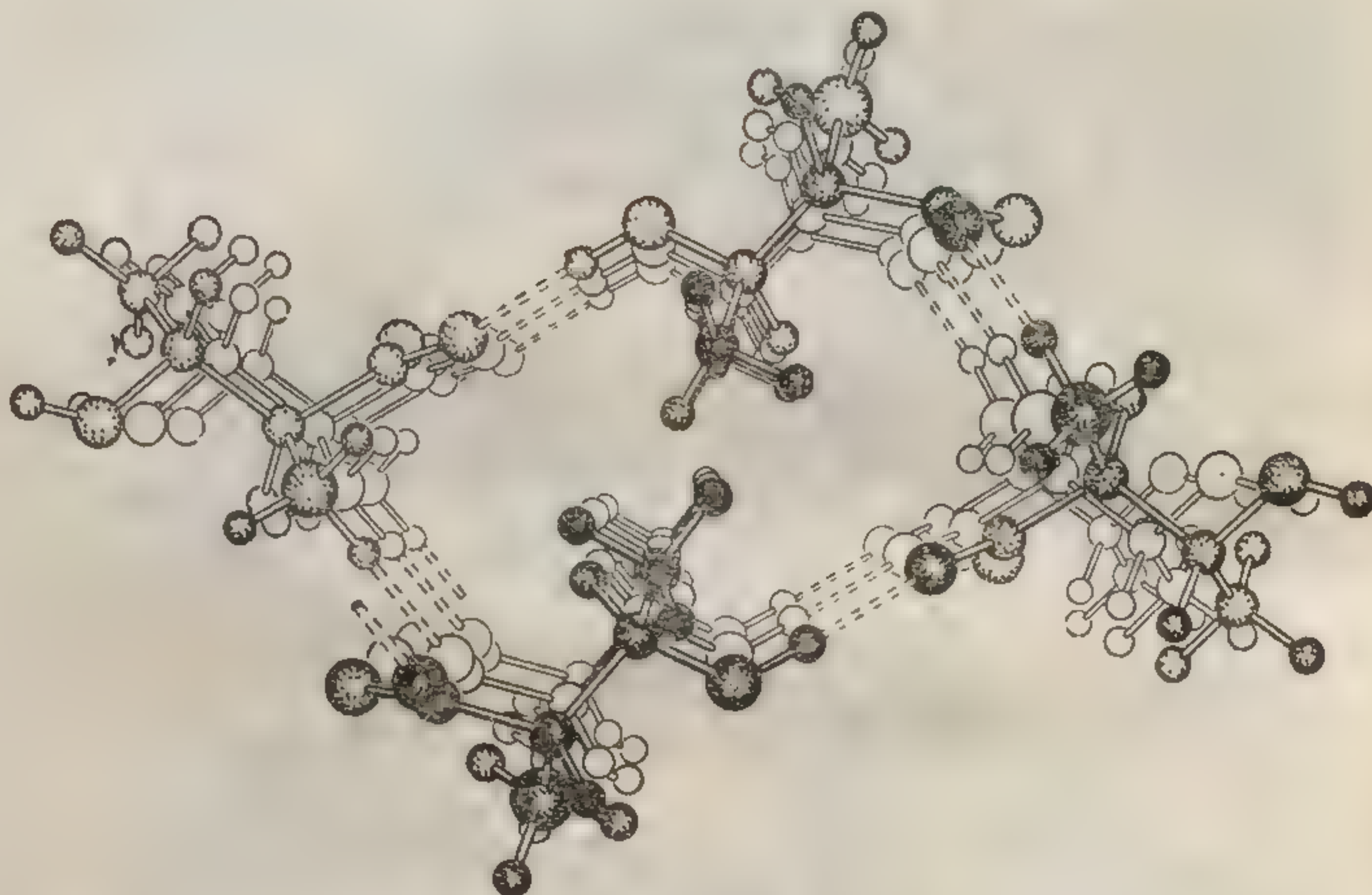
контакта между двумя атомами углерода равно 4,0 Å, а между атомом углерода и атомом кислорода — около 3,4 Å. Таким образом, силы отталкивания будут наименьшими в *транс*-конфигурации.



Ф и г. 13. Изображение внутри- и межмолекулярных деталей, построенное на основании карт распределения электронной плотности. Приведены размеры элементарной ячейки, содержащей четыре молекулы L-треонина.

3) В кристаллах реализуется максимально возможное число водородных связей. Каждая пептидная связь содержит один потенциальный донор (N—H) и один потенциальный акцептор (атом кислорода карбонильной группы) водородной связи. Во всех изученных кристаллах амидов и пептидов наименьшее расстояние между ковалентно не связанными пептидными атомами азота и кислорода составляет  $2,9 \pm 0,1$  Å. Это расстояние намного меньше вандерваальсова расстояния





Фиг. 14. Изображение трехмерной упаковки молекул L-треонина в кристалле.

контакта. В кристалле около каждой пептидной связи имеются комплементарные, ковалентно не связанные атомы кислорода (карбонильные) и атомы азота

Таблица 8  
Внутримолекулярные расстояния между атомами и углы связей в молекуле треонина  
(Shoemaker et al., J. Am. Chem. Soc., 72, 2328, 1950)

Расстояние, Å		Угол, град	
C1—C2	1,517	O1—C1—O2	126,9
C2—C3	1,542	O1—C1—C2	117,0
C3—C4	1,505	O2—C1—C2	116,1
C2—N	1,490	C1—C2—C3	113,4
C1—O1	1,236	C1—C2—N	110,4
C1—O2	1,253	C2—C3—C4	112,5
C3—O3	1,424	C2—C3—O3	104,1
N...O1	2,672	N—C2—C3	108,0
N...O3	2,678	O3—C3—C4	110,5
C1...O4	3,084		
O2...O4	3,106		

У в молекуле (.),  
стояние от У в моле-  
2) Здесь даны  
только те, которые  
от всех прочих атом



Таблица 9

Межмолекулярные расстояния между атомами и углы  
связей в молекуле треонина

(Shoemaker et al., J. Am. Chem. Soc., 72, 2328, 1950)

Атом X в молекуле M	Атом Y в молекуле (1)	Эквивалентное расстояние контакта с молекулой (2) <sup>1)</sup>	Рас- стояние X ... Y, Å	Угол CX ... Y, град	Угол X ... YC, град
------------------------	-----------------------	---	----------------------------------	---------------------------	---------------------------

А. Водородные связи

N	O-2	M <sub>001</sub>	M <sub>001</sub>	2,90	116	128
O-3	O-1	A <sub>100</sub>	A	2,66	120	136
N	O-2	B <sub>010</sub>	B	2,80	98	122
N	O-3	C <sub>010</sub>	C <sub>011</sub>	3,10	132	120

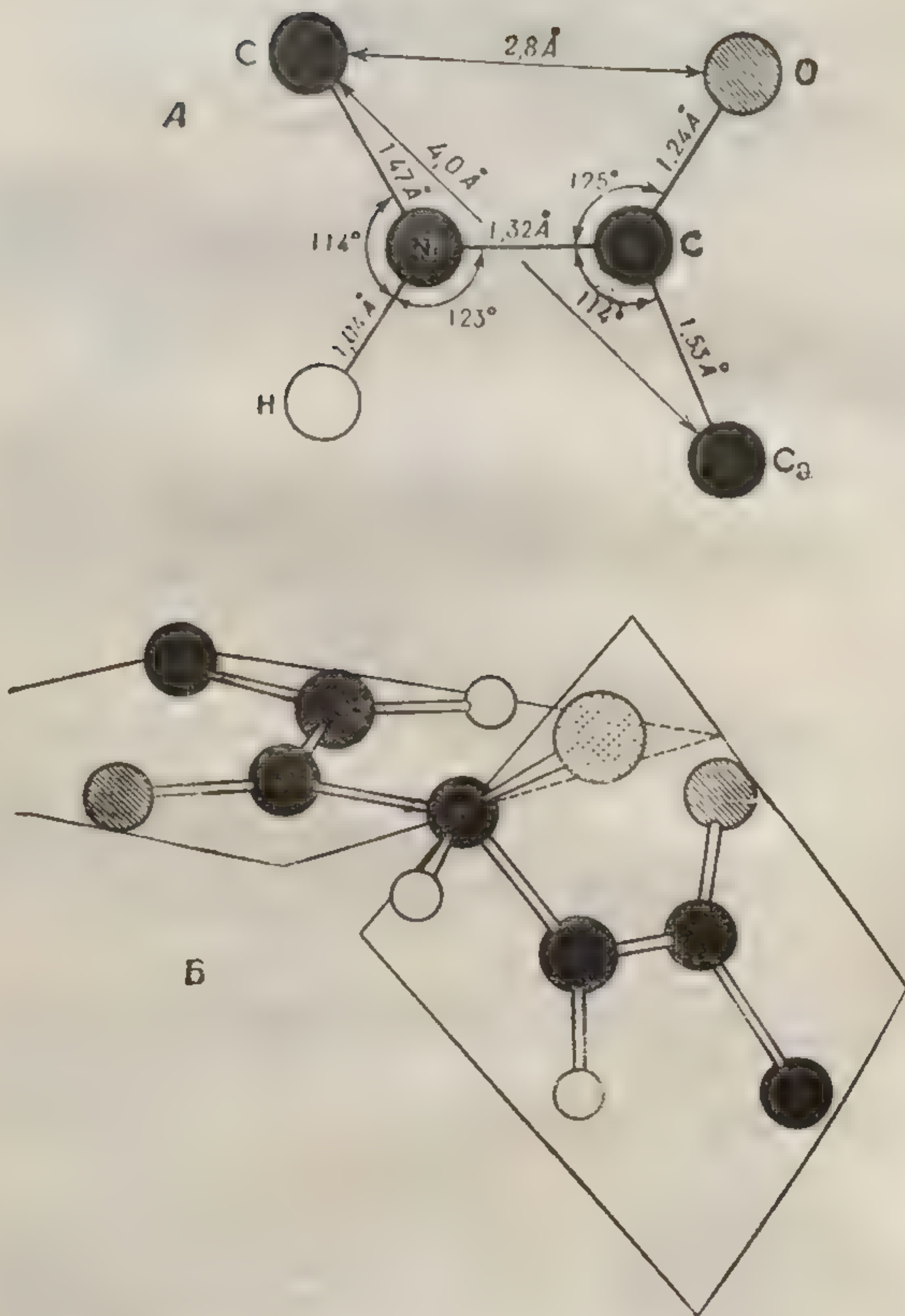
Б. Прочие расстояния<sup>2)</sup>

N	C-2	M <sub>001</sub>	M <sub>001</sub>	3,92		
C-3	C-4	M <sub>001</sub>	M <sub>001</sub>	3,94		
N	C-4	M <sub>001</sub>	M <sub>001</sub>	3,73		
O-1	O-2	M <sub>001</sub>	M <sub>001</sub>	3,14		
O-1	C-4	A	A <sub>100</sub>	3,67		
C-4	O-1	B	B <sub>010</sub>	3,69		
C-1	C-2	B	B <sub>010</sub>	3,71		
O-1	C-2	B	B <sub>010</sub>	3,59		
O-1	O-2	B	B <sub>010</sub>	3,92		
O-2	O-1	B	B <sub>010</sub>	4,00		
N	O-1	B <sub>011</sub>	B <sub>001</sub>	3,08	161	134
C-4	C-4	C	C <sub>001</sub>	3,79		
C-3	C-4	C	C <sub>001</sub>	3,81		
O-3	C-2	C <sub>010</sub>	C <sub>011</sub>	3,28		
O-3	C-4	C <sub>010</sub>	C <sub>011</sub>	3,74		
O-3	C-4	C <sub>010</sub>	C <sub>011</sub>	3,83		
N	C-4	C <sub>010</sub>	C <sub>011</sub>	3,87		

<sup>1)</sup> В каждом случае, когда речь идет о расстоянии от X в молекуле M до Y в молекуле (1), эквивалентное расстояние контакта определяется как расстояние от Y в молекуле M до X в молекуле (2).

<sup>2)</sup> Здесь даны все расстояния, меньшие или равные 4 Å; не включены только те, которые приведены в верхней части таблицы, а также расстояния от всех прочих атомов до атомов водорода.





Фиг. 15. Геометрия пептидной связи (штриховка имеет тот же смысл, что на фиг. 11).  
 А. Параметры пептидной связи. Б. Пространственные взаимоотношения между соседними пептидными звеньями.

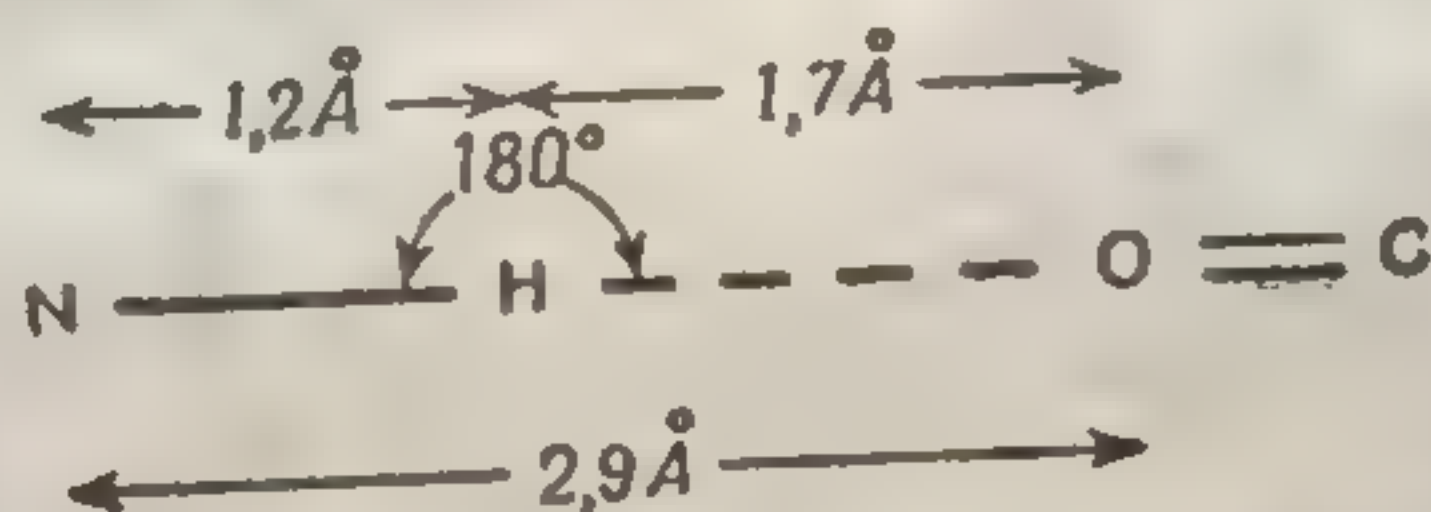
(в строении А...  
 то...  
 для...  
 Основ...  
 ченных в резул...  
 а также на...  
 ния. По...  
 стимых ко...  
 этом, что...  
 кул, будут...  
 кристаллических  
 тили внима...

Фиг. 16. Геометрия...  
 в стабилизации...  
 сталлографии и...  
 моделей пользую...  
 более стабильной...  
 кованная» структ...  
 посредственно не...  
 находятся друг...  
 сколько это воз...  
 диусов.  
 Если строить...  
 используя потен...  
 к образованию...  
 реть два типа стр...  
 1. Модели с...  
 Если каждая по...  
 ными связями бо...  
 зультате получае...  
 либо трехмерная...  
 структура.  
 2. Модели, в...  
 группы одного а...



(в группах N—H) точно на таком расстоянии. Кроме того, водородная связь N—H ... O линейна или почти линейна (фиг. 16).

Основываясь на этих трех главных выводах, полученных в результате структурного анализа кристаллов, а также на данных о длинах связей и углах между ними, Поллинг и Кори перешли к исследованию допустимых конфигураций полипептидной цепи, приняв при этом, что выводы, касающиеся структуры малых молекул, будут справедливы и при изучении структуры некристаллических полипептидов. Кроме того, они обратили внимание на важную роль дисперсионных сил



Фиг. 16. Геометрия водородной связи между пептидными звеньями.

в стабилизации конформации. В молекулярной кристаллографии и при «конструировании» молекулярных моделей пользуются аксиомой, которая гласит, что наиболее стабильной структурой всегда будет «плотно упакованная» структура, т. е. такая, в которой атомы, нековалентно связанные друг с другом ковалентно, находятся друг от друга на расстоянии, равном (насколько это возможно) сумме вандерваальсовых радиусов.

Если строить молекулярные модели, максимально используя потенциальные возможности полипептида к образованию водородных связей, то следует рассмотреть два типа структурных моделей:

1. Модели с водородными связями между цепями. Если каждая полипептидная цепь соединена водородными связями более чем с одной другой цепью, то в результате получается либо макромолекулярный «лист», либо трехмерная поперечно сшитая макромолекулярная структура.

2. Модели, в которых атом кислорода карбонильной группы одного аминокислотного остатка образует во-







дородную связь с NH-группой другого остатка той же цепи. Такая *внутримолекулярная* структура может возникнуть в результате закручивания двух (допускающих свободное вращение) связей, при котором одна карбонильная группа и одна NH-группа оказываются пространственно сближенными и тем самым создаются условия для образования водородной связи. Принимая во внимание ограничения, связанные с планарностью пептидной связи и *транс*-конфигурацией (фиг. 15), можно сказать, что единственными связями в остоле пептида, вокруг которых допустимо свободное вращение, являются связи между C- $\alpha$  и углеродом карбонильной группы, а также между C- $\alpha$  и азотом. Изучение молекулярных моделей ясно показывает, что в полипептидной цепи не могут возникать водородные связи между атомом кислорода карбонильной группы и азотом NH-группы, принадлежащими к двум соседним ковалентно связанным аминокислотным остаткам. Таким образом, если образуются *внутримолекулярные* водородные связи, то они должны образовываться между аминокислотными остатками, разделенными более чем одной аминокислотой. Для того чтобы реализовать все возможности образования водородных связей путем *внутримолекулярных взаимодействий*, полипептидная цепь должна обязательно образовывать какую-то определенную *периодическую структуру*. Такой периодической структурой для линейной полимерной цепи является *спираль*. На фиг. 17 изображены две различные полипептидные спирали.

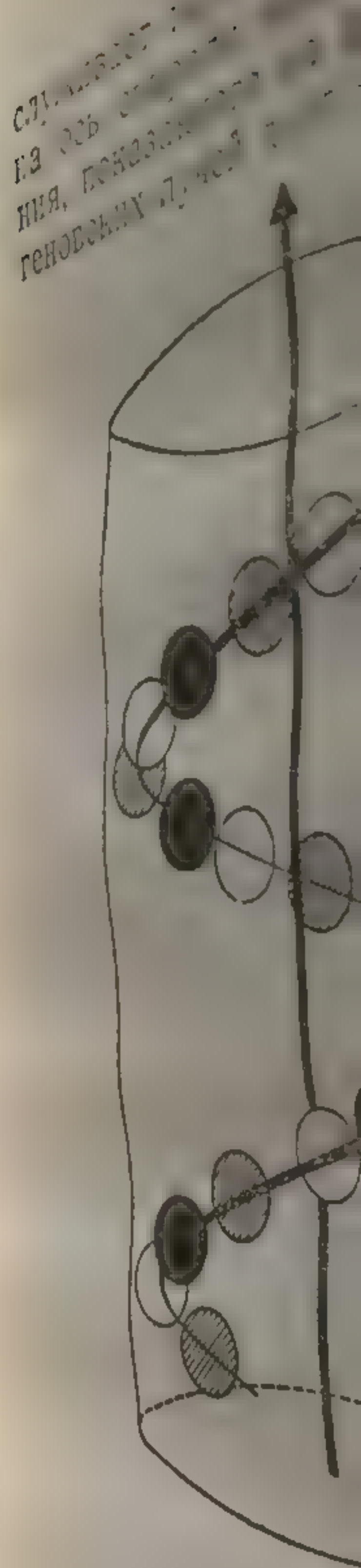
## 2. $\alpha$ -СПИРАЛЬ

Обе спиральные конфигурации, показанные на фиг. 17, согласуются с выводами, полученными при исследовании структурных моделей малых молекул. Полич и Кори постулировали, что из двух указанных спиралей более стабильна правая  $\alpha$ -спираль, так как эта структура оптимальна с точки зрения дисперсионных взаимодействий.

В принципе при изучении рентгенограмм кристаллических природных белков можно выяснить, имеются ли в них  $\alpha$ -спирали. На практике такое исследование



очень осложнено, главным образом из-за непомерно большого количества экспериментальных данных, поскольку в кристалле белка число различных фиксированных межатомных расстояний чрезвычайно велико. Как мы увидим далее, без полной расшифровки трехмерной структуры кристалла невозможно установить структуру какого-либо участка белка. Существование  $\alpha$ -спирали легче обнаружить экспериментально на полипептиде, в котором число различных группировок атомов значительно меньше. Это требование естественно выполняется в случае синтетического полипептида, у которого все боковые цепи аминокислот идентичны. В то время, когда было постулировано существование  $\alpha$ -спирали, было известно два таких полипептида — поли- $\gamma$ -бензил-L-глутаминовая кислота (ПБЛГ) и поли-L-аланин. Эти синтетические полимеры могут быть получены в форме волокон — важная структурная особенность, упрощающая интерпретацию рентгенограмм. Сама природа волокна предопределяет существование в *одном измерении* (вдоль оси волокна) регулярной, упорядоченной структуры; в остальных направлениях структура менее упорядочена. Если волокно действительно построено из спиральных полипептидов, то направление его оси, по-видимому, совпадает с направлением осей большинства спиралей. Если такие волокна состоят из  $\alpha$ -спиральных полипептидов, то наблюдаемая дифракционная картина должна отражать три главные детали, характеризующие такую спираль: 1) одинаковое расстояние между идентичными атомами вдоль оси волокна (т. е. вдоль оси спирали), 2) расстояние между идентичными атомами, разделенными одной пептидной связью, и 3) расстояние между идентичными атомами на смежных витках спирали. Эти расстояния и их проекции на ось спирали показаны на фиг. 18. Проекции на ось спирали должны находиться в обратном соотношении с сильными рефlekсами в той дифракционной картине, которой следует ожидать согласно теории Кокрэна, Крика и Вэнда. Рентгенограммы, полученные для ПБЛГ и поли-L-аланина, весьма убедительно подтверждают существование  $\alpha$ -спиральной структуры. В этом отношении особого внимания за-

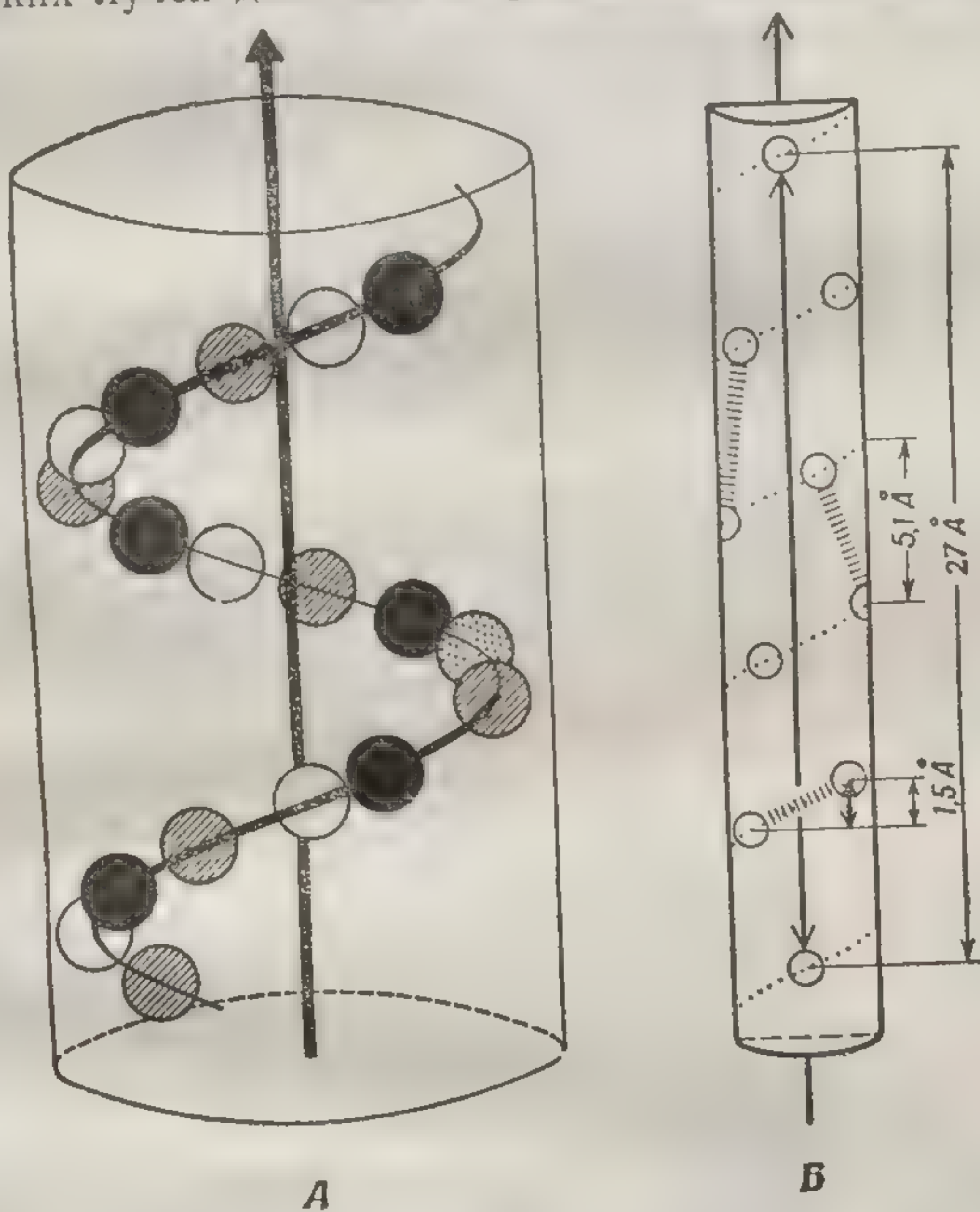


Фиг. 18. Топология  
Показаны размеры ха-

тированных и регу-  
фигурациях в воло-  
атомы жестко ори-  
дает полного пред-  
молекулы. Следова-  
тур, изображенные  
примере волокна. Д



служивает интервал  $1,5 \text{ \AA}$ , характеризующий проекцию на ось спирали наименьшего повторяющегося расстояния, показанного на фиг. 18. Картина дифракции рентгеновских лучей дает нам информацию о жестко ориен-



Фиг. 18. Топологическая модель спирального полимера. Показаны размеры характеристических векторов спиральной упаковки.

тированных и регулярно повторяющихся атомных конфигурациях в волокне. Но так как в волокне не все атомы жестко ориентированы, его рентгенограмма не дает полного представления об атомной конфигурации молекулы. Следовательно, детали  $\alpha$ -спиральных структур, изображенные на фиг. 17, невозможно изучать на примере волокна. Для того чтобы получить информацию



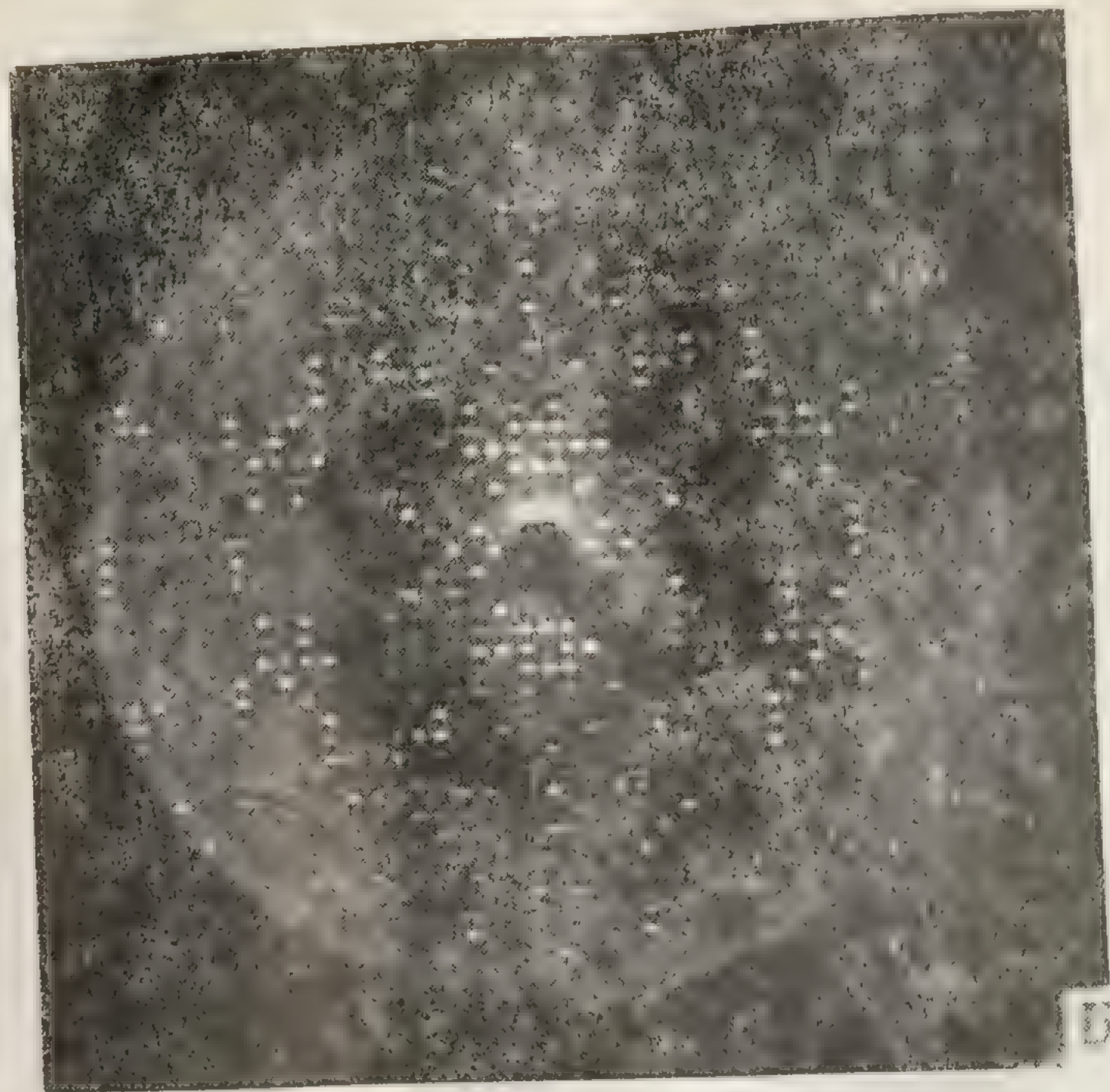
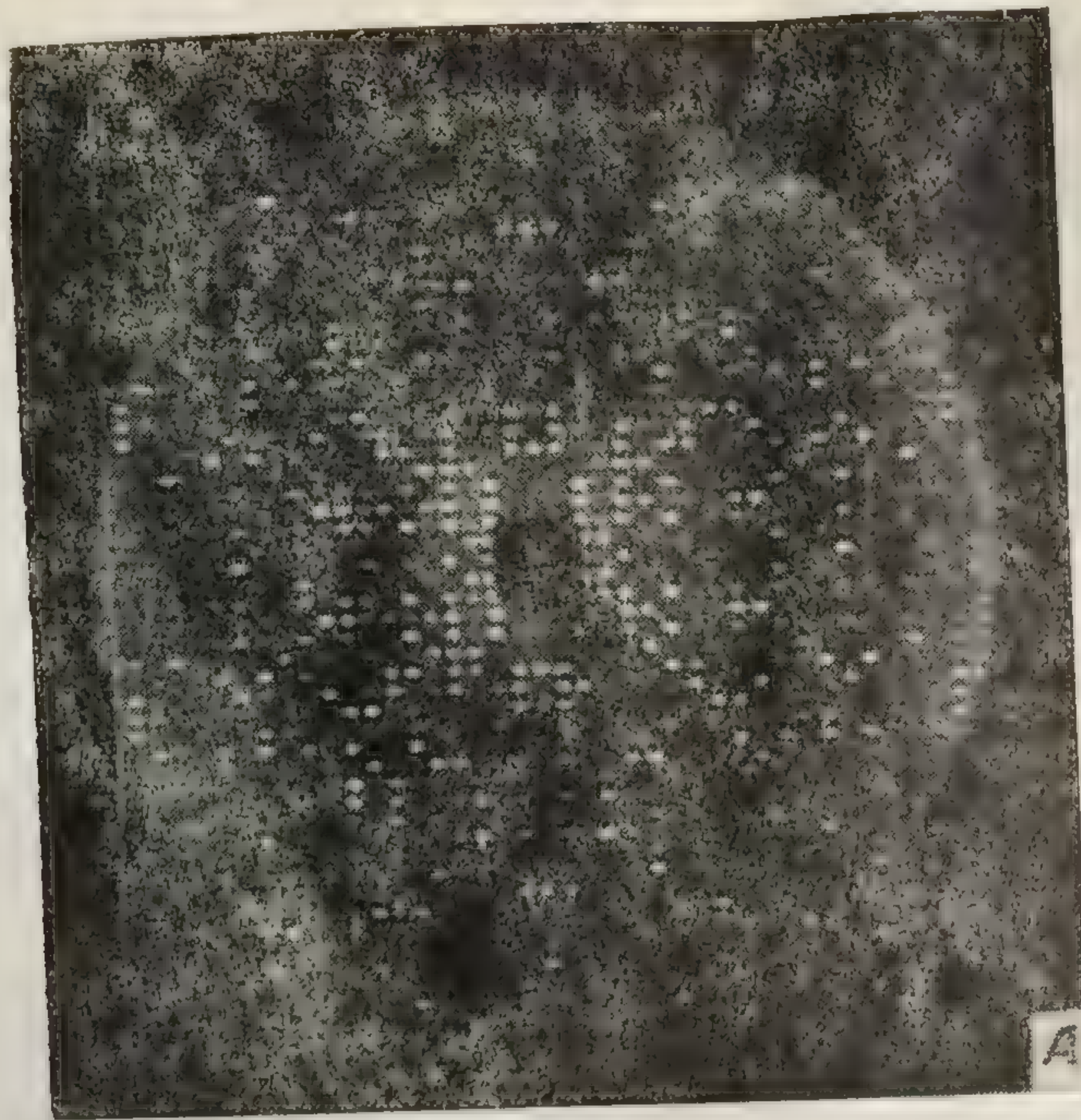
о структуре  $\alpha$ -спирали на этом уровне, необходимо исследовать систему, в которой все атомные координаты строго фиксированы. Такой системой является кристалл.

### Дифракция рентгеновских лучей и структура кристаллов

Рассмотрим рентгенограмму (фиг. 19), которая получается при рассеянии пучка рентгеновских лучей кристаллом модифицированного ферментного белка — диизопропилфосфорилтрипсина (ДИФ-трипсина). Обратите внимание на регулярное распределение рефлексов: симметрия дифракционной картины отражает симметрию кристалла. Между расстояниями от центра рентгенограммы до рефлексов и размером повторяющейся единицы, или элементарной ячейки кристалла существует обратная зависимость: чем больше размеры элементарной ячейки (минимального элементарного объема кристалла, из которого весь кристалл может быть построен путем одних лишь трансляций), тем ближе к центру располагаются на пленке максимумы интенсивности. Симметрию расположения элементарных ячеек и размеры элементарной ячейки можно легко определить по трем рентгенограммам, полученным при различных ориентациях кристалла. При этом для определения симметрии и размеров достаточно рассмотреть ближайшие к центру рефлекс, которые вследствие указанной выше обратной зависимости соответствуют наибольшим значениям периода.

Интенсивность рефлексов зависит от распределения атомов внутри элементарной ячейки и от электронной плотности каждого данного атома. Симметрия элементарной ячейки кристалла L-треонина, использованного для структурного анализа (табл. 8 и 9), детально представлена на фиг. 11. Дифракционная картина, изображенная на фиг. 19, имеет ту же характерную симметрию, что и кристалл L-треонина (пространственная группа  $P2_12_12_1$ ). Однако в действительности расстояние, характеризующее положение рефлексов, будет различным для этих двух кристаллов, что обусловлено разными размерами элементарной ячейки. Большей элементарной ячейке (ДИФ-трипсин) соответствуют значи-

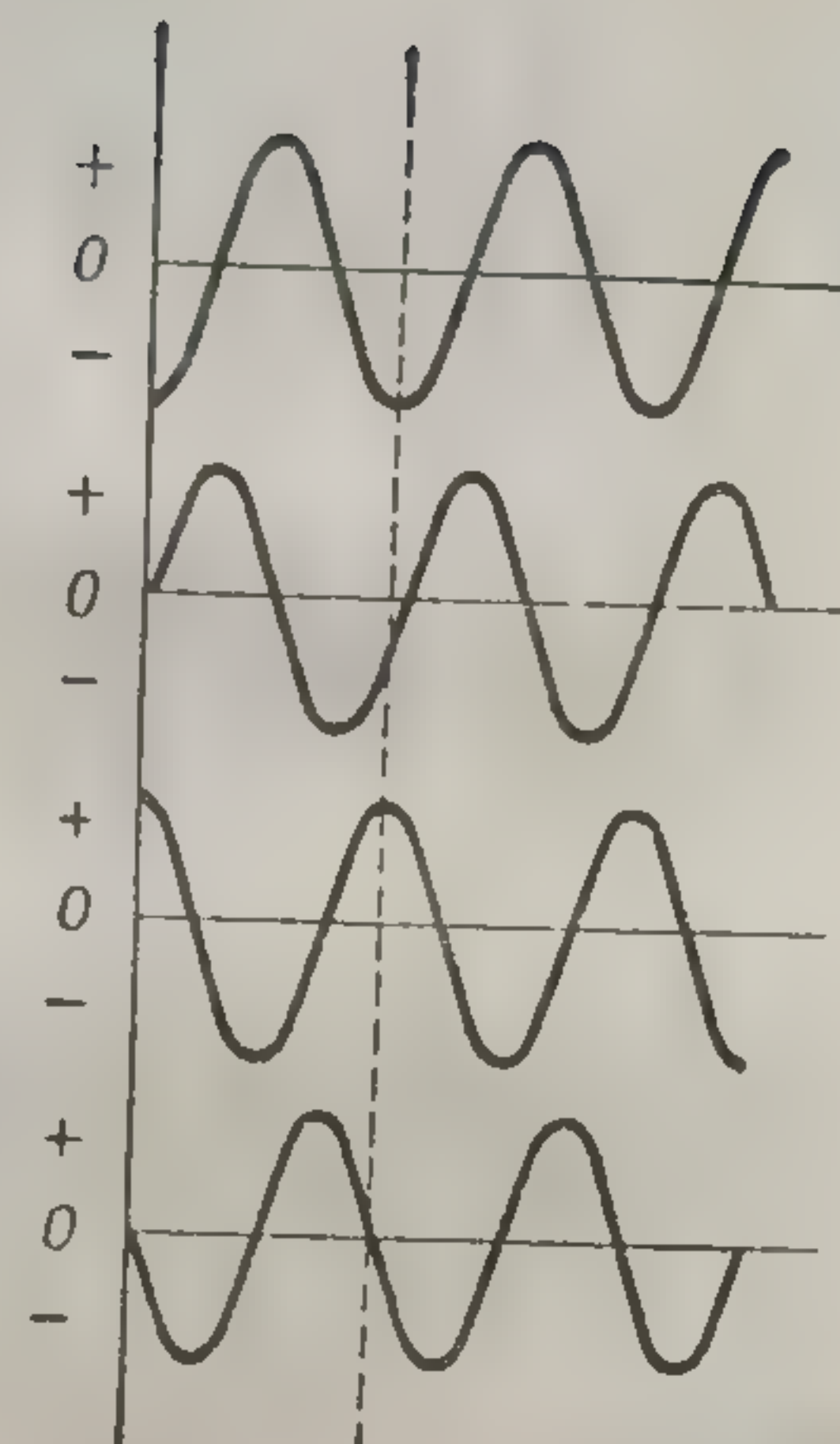
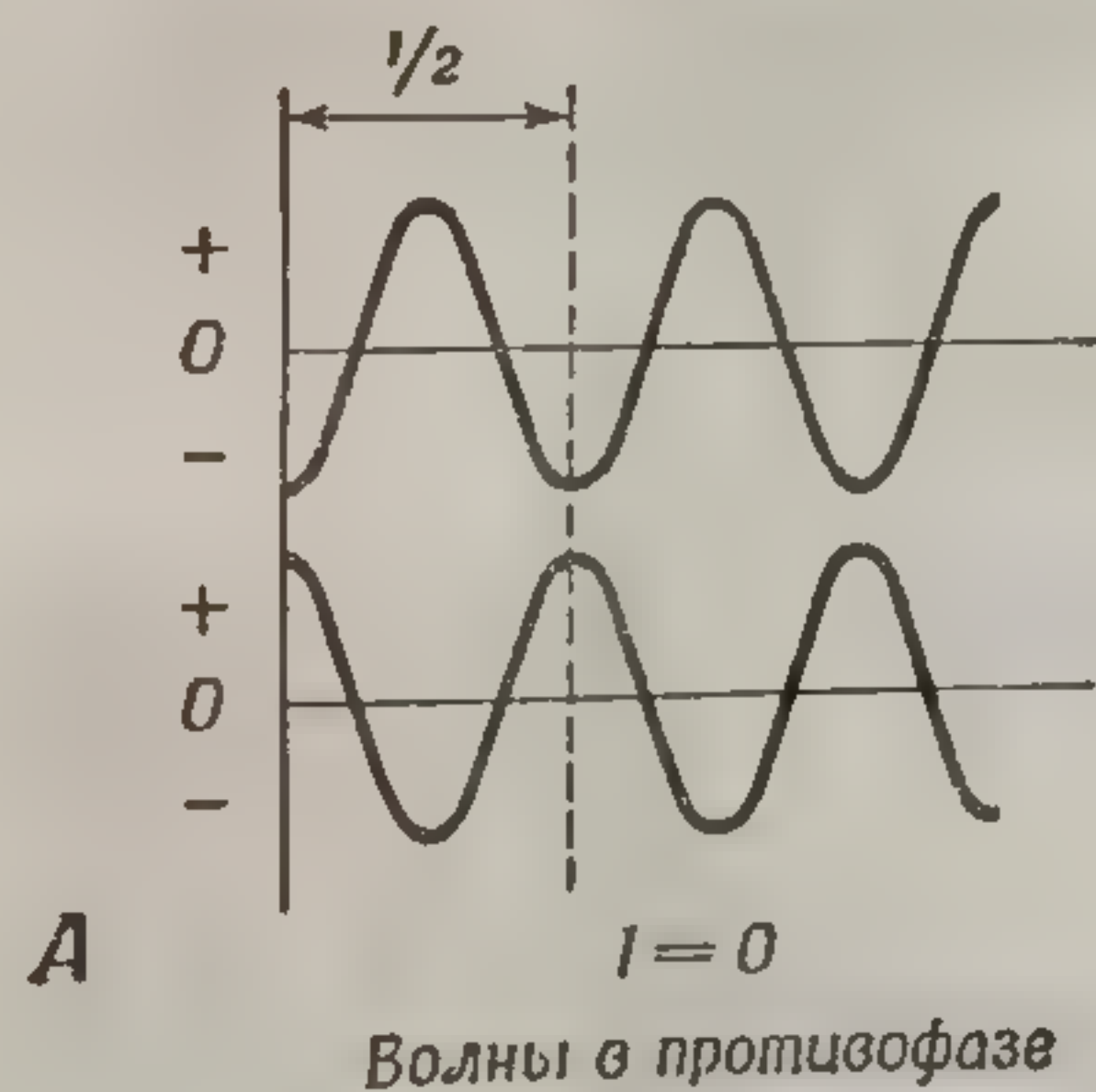
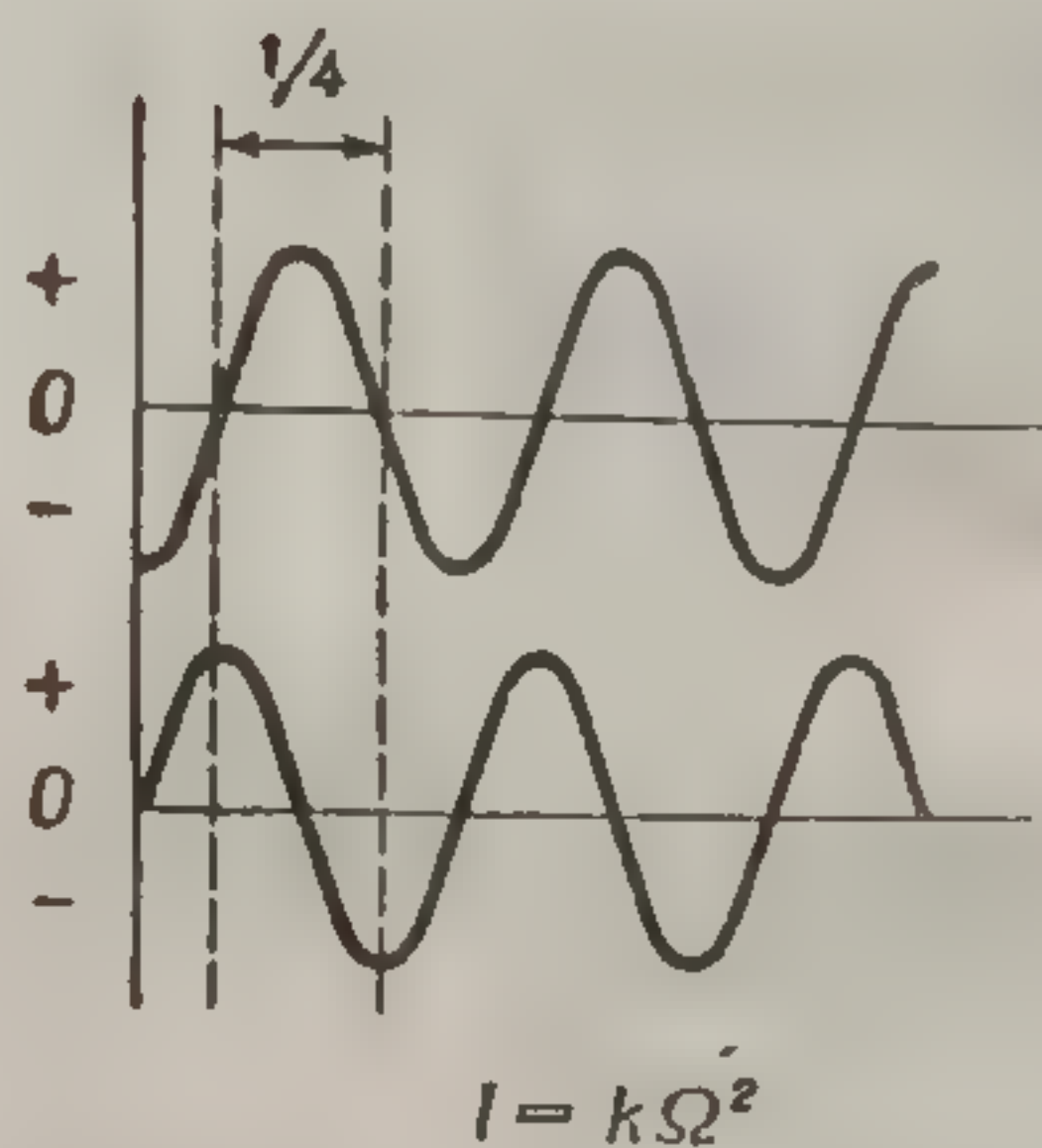
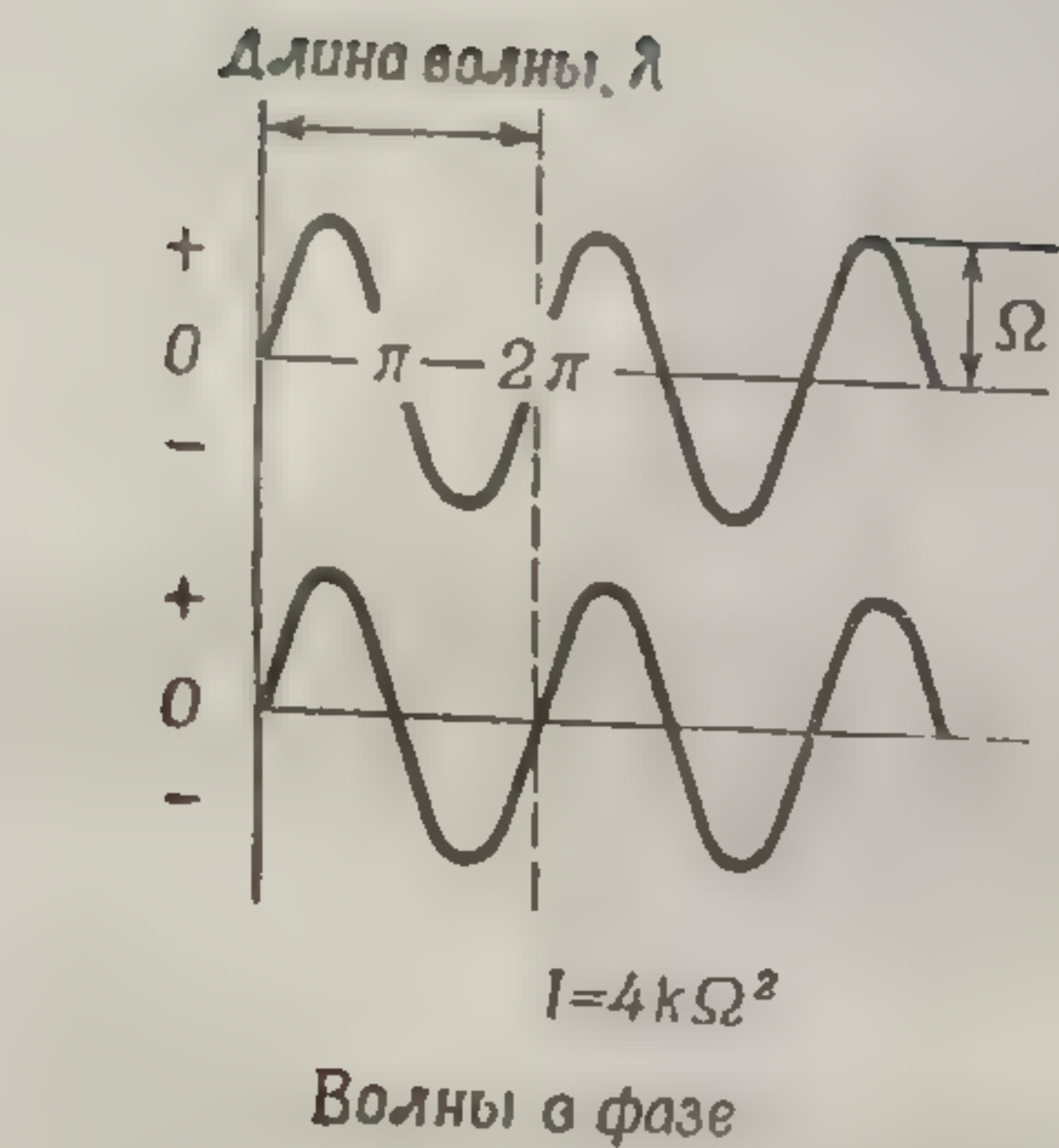




Фиг. 19. Две фотографии дифракционных рентгенограмм кристалла диизопропилфосфоритрипсина (ДИФ-трипсина).

Симметрия рефлексов характеризует расположение атомов в определенной элементарной ячейке (пространственная группа  $P2_12_12_1$ ). *Пространственную группу* можно идентифицировать с помощью трех дифракционных рентгенограмм кристалла, каждая из которых снята при направлении луча, перпендикулярном одной из трех кристаллографических осей. Кристаллы L-треонина обладают такой же симметрией пространственной группы. Следует отметить различия в относительной интенсивности отдельных рефлексов. Данное количественное соотношение интенсивностей характеризует атомные координаты внутри элементарной ячейки ДИФ-трипсина.





Континуум слегка сдвинутых по фазе волн дает  $I=0$ , так как всем волнам в фазе  $\varphi$  соответствует равное число волн в фазе  $-\varphi$ .

Источники рентгеновских лучей

Б

Фиг. 20.

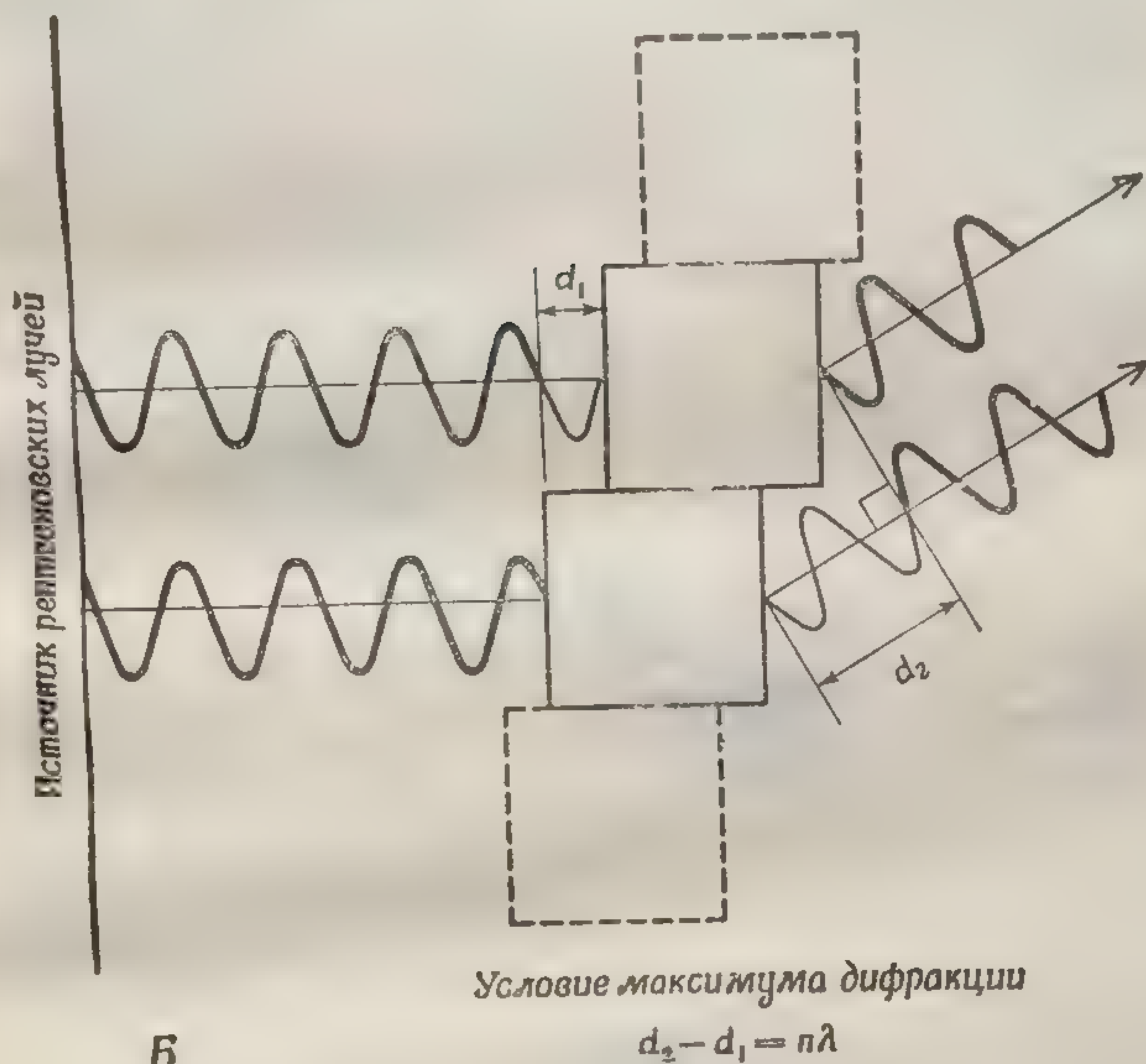
А. Характеристики электромагнитного излучения: длина волны, амплитуда, фаза. Символы  $\Omega$  и  $I$  обозначают соответственно амплитуду волны и результирующую интенсивность группы волн, распространяющихся в одном направлении.

В. Условия, необходимые для того, чтобы волны должны совпадать, равны

Фиг. 21. Обратите внимание на то, что относительно меньшие интервалы L-теорема отличается от относительной симметрии. Относительная симметрия, которую можно предсказать в первых, конфигурациях, симметрии элементов симметрии и интенсивности и 21.



## Двумерная совокупность элементарных ячеек

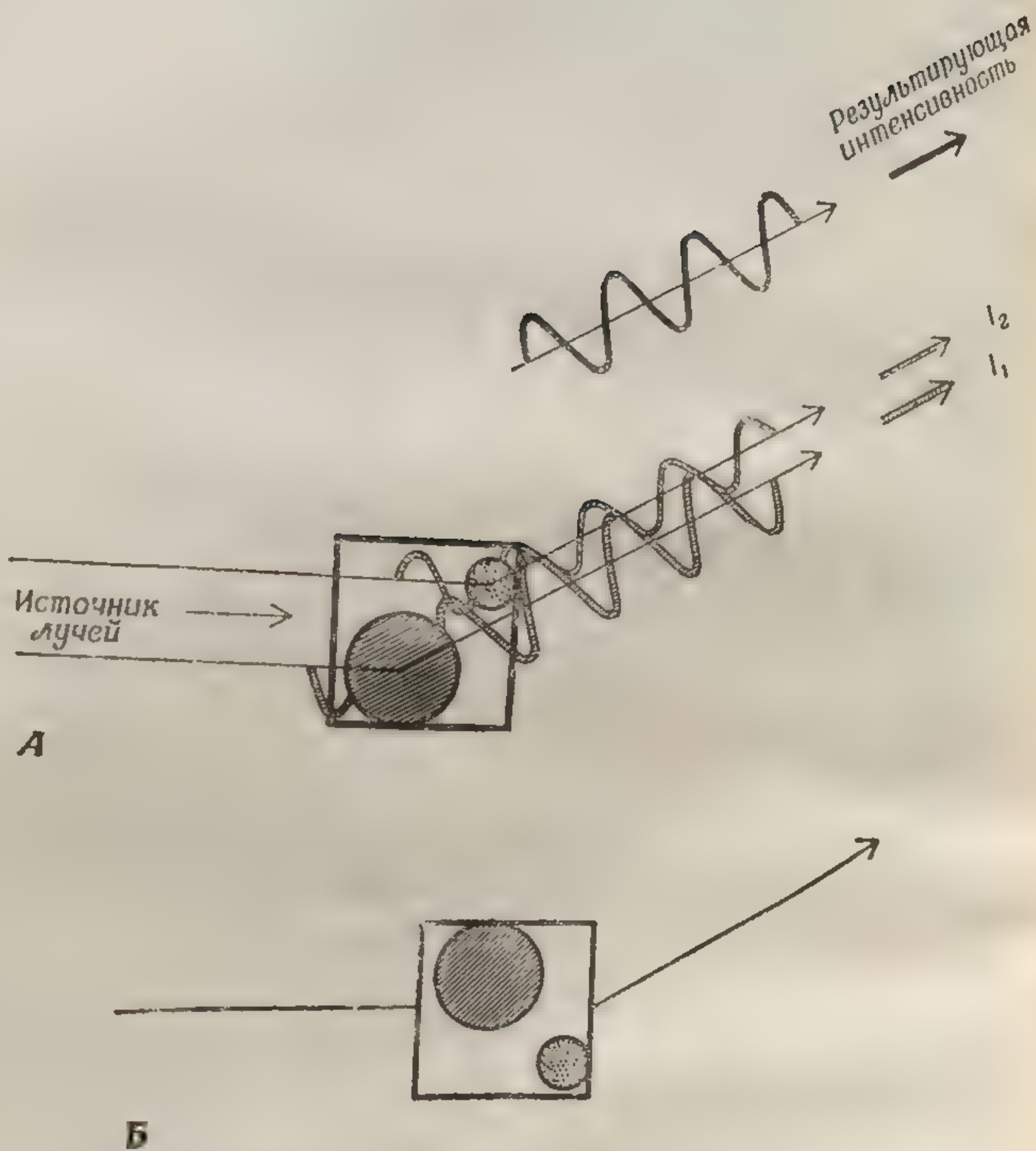


Ф и г. 20 (продолжение).

В. Условия, необходимые для получения дифракционного максимума: рассеянные волны должны совпадать по фазе, т. е. разность фаз  $d_2 - d_1$  должна быть равна целому числу ( $n$ ) длин волн  $\lambda$ .

тельно меньшие интервалы. Кроме того, рентгенограмма L-треонина отличается от рентгенограммы ДИФ-трип-сина относительной интенсивностью отдельных рефлекс-сов. Относительную интенсивность каждого рефлекса можно предсказать количественно, если известны, во-первых, конфигурация всех атомов в молекуле и, во-вторых, симметрия элементарной ячейки. Взаимосвязь симметрии элементарной ячейки, атомной конфигурации и интенсивности рефлексов показана на фиг. 20 и 21. Обратите внимание, что, зная атомную





Фиг. 21. Конфигурация атомов и интенсивность излучения, рассеянного в направлении дифракционного максимума. При двух разных конфигурациях, показанных на фигуре (А и Б), интенсивность дифрагированных лучей оказывается одинаковой.

конфигурацию и симметрию упаковки молекул в реальном пространстве, можно количественно предсказать интенсивность и фазу каждого рефлекса в трансформированном пространстве рентгенограммы. Справедливым будет и обратное заключение: если известны интенсивность (относительная) и фаза каждого рефлекса, то можно рассчитать координаты атомов и молекул в реальном

на. Значит, можно предсказать фазу каждого рефлекса, зная только интенсивность. Это и есть задача фазового анализа. Сложнее всего предсказать фазу рефлексов, которые имеют низкую интенсивность. Только в том случае, когда интенсивность рефлексов достаточно высока, можно предсказать фазу. В противном случае фазу можно предсказать только с помощью методов, основанных на предположении о симметрии молекулы.

Коль скоро имеет место предсказание и эксперимент, то фазу можно предсказать с помощью методов, основанных на предположении о симметрии молекулы. В настоящее время это предсказание можно сделать только для молекул, имеющих высокую симметрию. Для молекул, имеющих низкую симметрию, предсказание фазы невозможно. В этом случае фазу можно предсказать только с помощью методов, основанных на предположении о симметрии молекулы.

3. РЕГУЛЯРНОЕ СТРОЕНИЕ

После того как фазы рефлексов будут известны, можно будет рассчитать координаты атомов и молекул в реальном пространстве. Это и есть задача фазового анализа. В настоящее время это предсказание можно сделать только для молекул, имеющих высокую симметрию. Для молекул, имеющих низкую симметрию, предсказание фазы невозможно. В этом случае фазу можно предсказать только с помощью методов, основанных на предположении о симметрии молекулы.



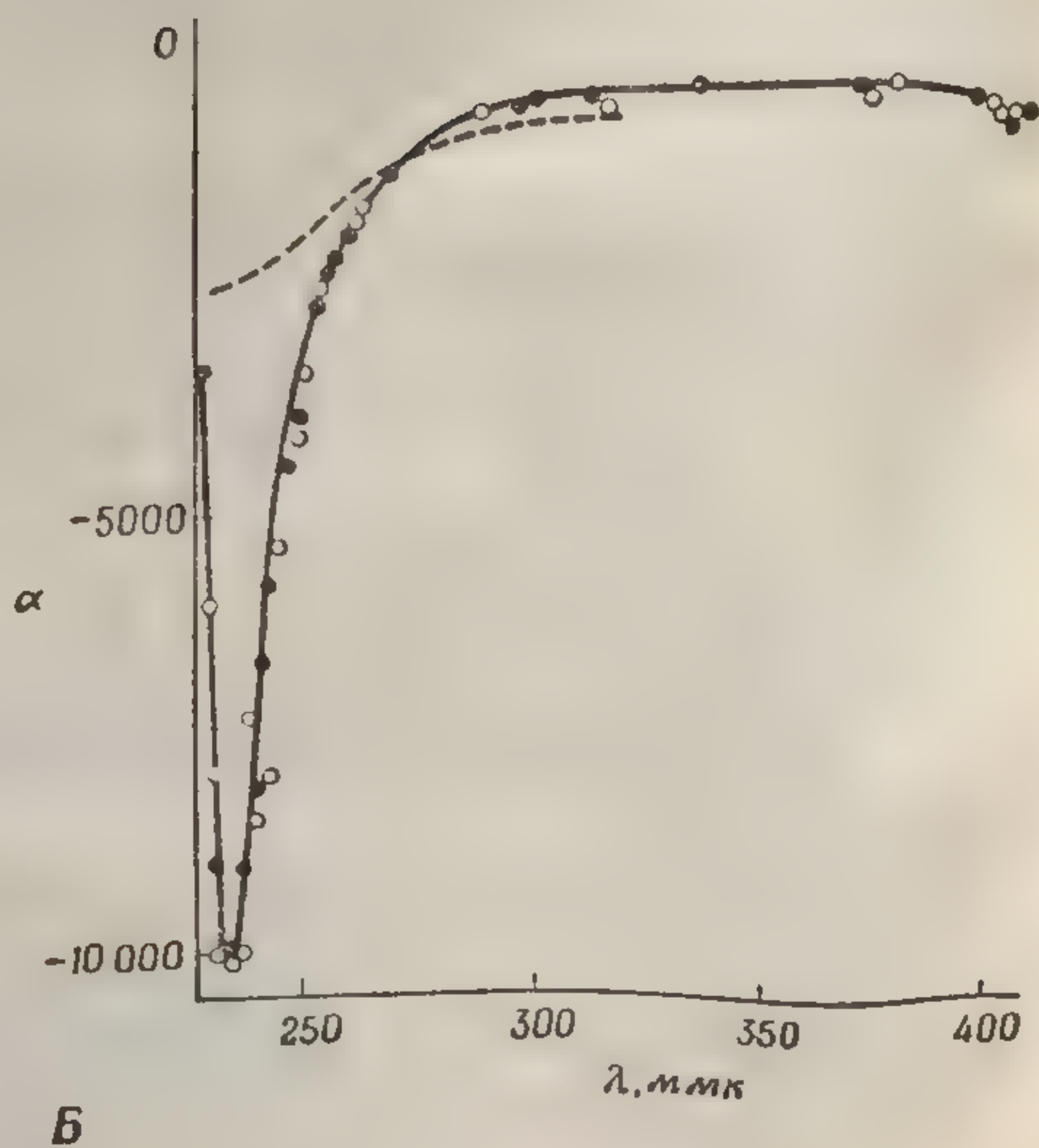
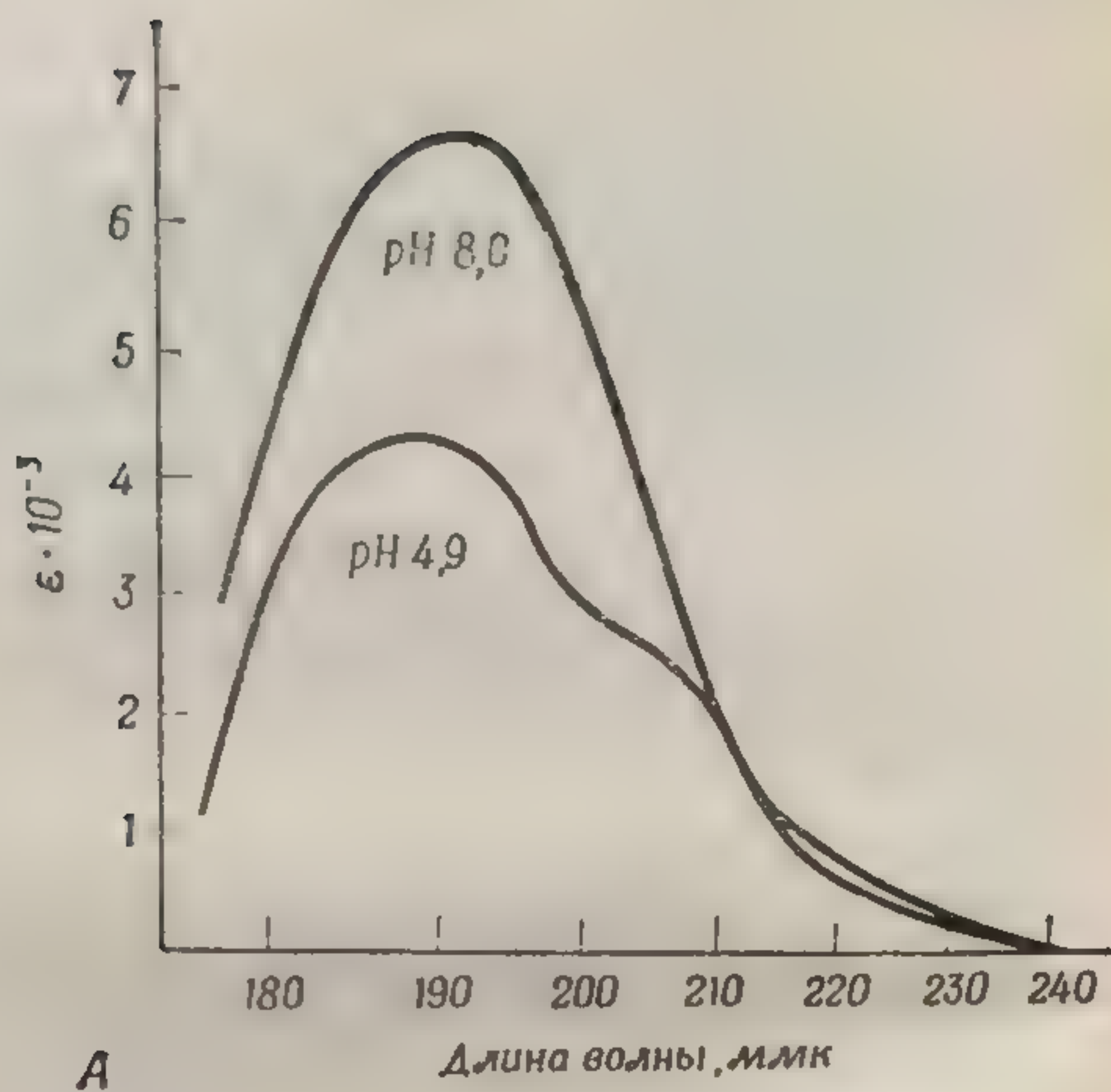
пространстве. К сожалению, на рентгенограммах фактически можно измерить только интенсивности рефлексов, поэтому координаты атомов нельзя найти непосредственно. Зная симметрию и размеры элементарной ячейки, а также плотность кристалла какой-либо малой молекулы, опытный химик, занимающийся структурным анализом, может высказать обоснованное предположение о том, какого рода атомные и молекулярные конфигурации укладываются в размеры этой элементарной ячейки. Сделав такое предположение, он может тем самым предсказать фазы всех атомов для каждого рефлекса и вычислить таким образом его относительную интенсивность. Только верное предположение приведет к некоторому соответствию между предсказанными и наблюдаемыми относительными интенсивностями.

Коль скоро имеется некоторое соответствие между предсказанием и экспериментом, можно точнее определять фазы с помощью ряда последовательных приближений, пока не будет получено наилучшее соответствие наблюдаемых и предсказанных интенсивностей. Такого рода расчеты выполняют теперь с помощью быстродействующих цифровых вычислительных машин. Однако органические молекулы с молекулярной массой порядка нескольких сотен дальтон практически представляют тот предел, до которого можно находить правильные фазы (и, следовательно, координаты атомов) таким методом «отгадывания». Для установления структуры больших молекул (а размеры белковых молекул необычайно велики) необходимо решать проблему фаз для каждого максимума в отдельности. Важность практических методов решения проблемы фаз для больших молекул столь велика, что разработка их была недавно отмечена присуждением трех Нобелевских премий.

### 3. РЕГУЛЯРНОЕ СТРОЕНИЕ ЦЕПИ И СТРУКТУРА БЕЛКА В РАСТВОРЕ

После того как было установлено существование  $\alpha$ -спиральной структуры в упомянутых выше волокнах, перед исследователями встал вопрос о наличии спиральных структур в других синтетических полипептидах





Тру...

В...

Обществен...

ков в рас...

Красная...

вот дик...

Если политическая  
рафин, то с...  
тельны. А с...  
вовлечении...  
изменяется...  
лебаний.

Ультрафиолетовый спектр, обусловленный вследствие групп и изменений водородных в спектрах кристаллических образуют их связями структурными. Так как различий

Фиг. 22. Некотър характере д.ч. С

А. Спектр в  
ной контр в  
Б. Удельное  
бина ( ) при  
структурой при  
при 23, мик  
Б зак



и в белках и о том, насколько такие структуры сохраняют свою целостность в водной среде, т. е. в той среде, где функционирует большинство ферментов.

Трехмерная структура белковых молекул в растворе не может быть определена методом дифракции рентгеновских лучей. Но если  $\alpha$ -спираль остается интактной в растворе, то регулярность ее строения, в частности регулярное геометрическое расположение карбонильных групп и NH-групп, а также регулярное распределение водородных связей, в какой-то степени дает возможность предсказывать определенные физические свойства. Для обнаружения признаков регулярности структуры у белков в растворе используются такие методы, как инфракрасная и ультрафиолетовая спектроскопия, а также метод дисперсии оптического вращения.

Если полипептид находится в  $\alpha$ -спиральной конфигурации, то его *инфракрасный* (т. е. колебательно-вращательный) спектр будет изменен вследствие того, что при вовлечении пептидных N—H-связей в водородные связи изменятся частоты их валентных и деформационных колебаний.

*Ультрафиолетовый спектр* пептидной связи (т. е. спектр, обусловленный электронными переходами) изменится вследствие регулярной ориентации карбонильных групп и изменения их электронных конфигураций, обусловленного тем, что их расположение в спирали закреплено водородными связями. Сходные эффекты отмечены в спектрах кристаллов простых амидов, когда молекулы их образуют упорядоченную, объединенную водородными связями структуру.

Так как *оптическое вращение* возникает вследствие различий во взаимодействии асимметрического

◀ Фиг. 22. Некоторые физические свойства полипептидов и белков, характерные для спиральной структуры, скрепленной водородными связями.

А. Спектр в дальнем ультрафиолете поли-L-глутаминовой кислоты при спиральной конфигурации (рН 4,9) и при конфигурации статистического клубка (рН 8,0).  
Б. Удельное вращение в ультрафиолете ферригемоглобина (●) и ферримоглобина (○) при рН 6,6 и 25°. В обоих белках доля участков с  $\alpha$ -спиральной структурой примерно одинакова. Пунктирная кривая, на которой нет впадины при 230 мк, относится к денатурированным структурам, предположительно представляющим собой статистический клубок.



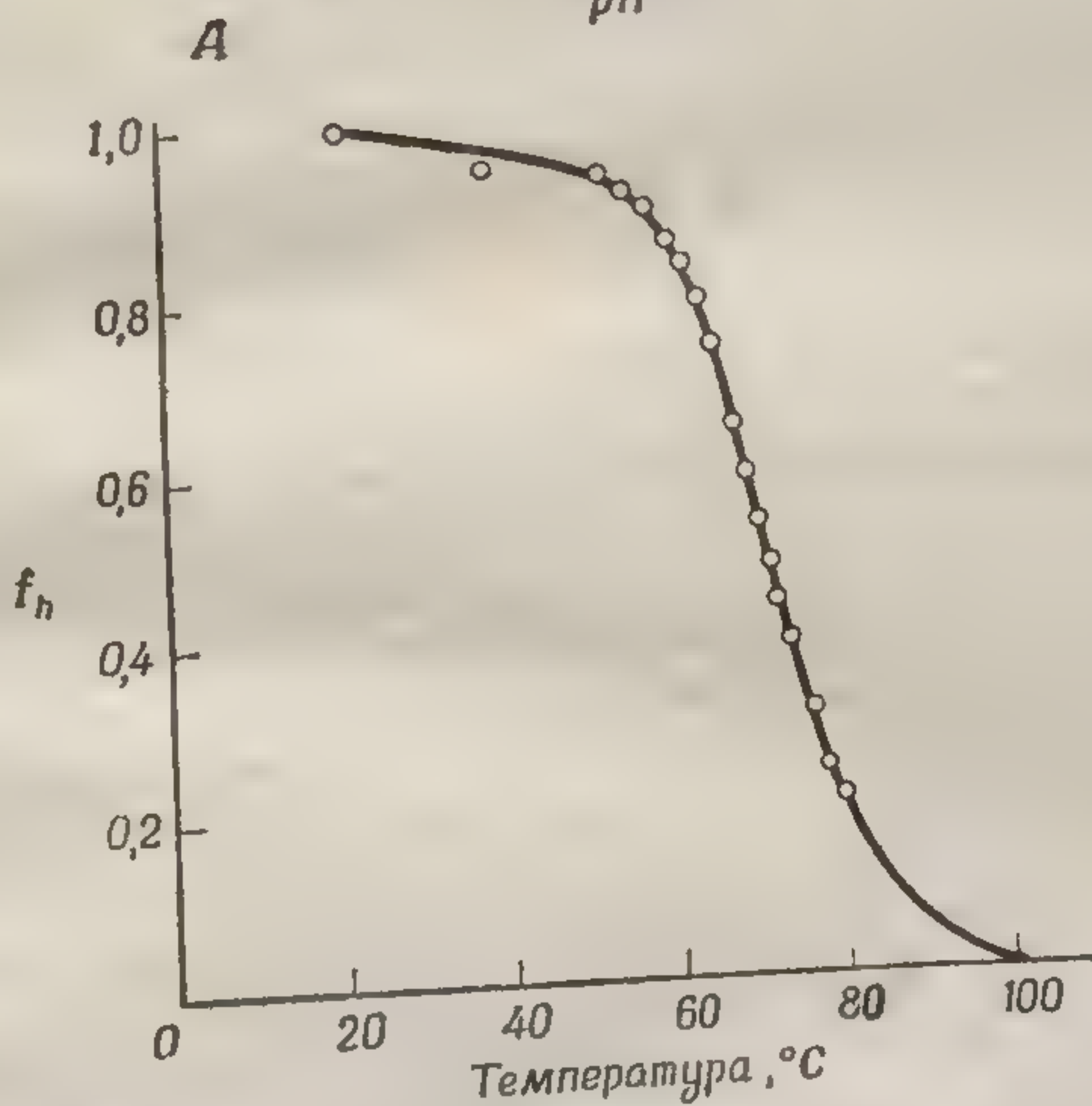
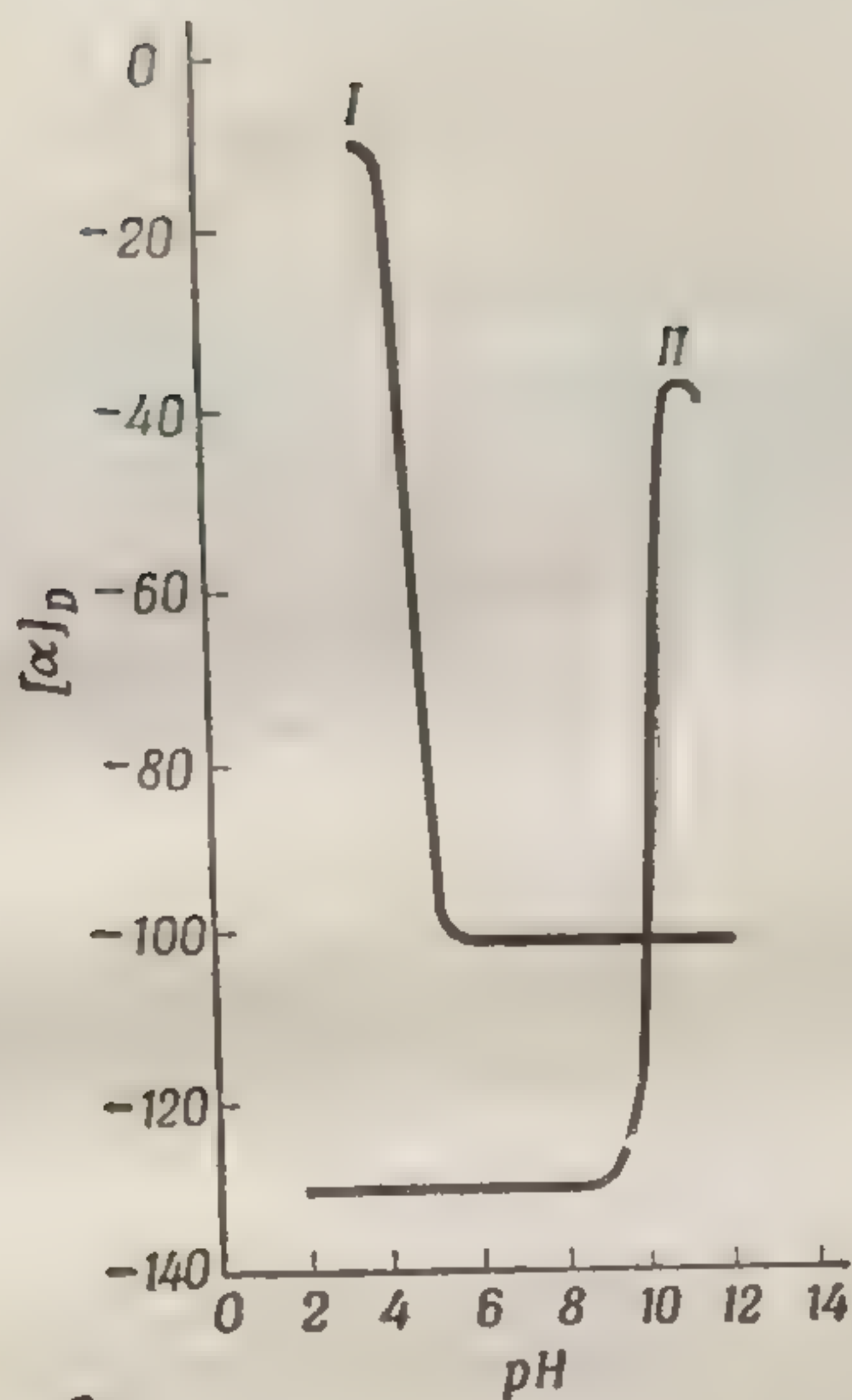
полярного окружения с хромофором (группа, поглощающая электромагнитное излучение) в двух его электронных состояниях — основном и возбужденном, — то оптическая активность спирализованных и неспирализованных молекул белка должна быть различной. Следует отметить, что правая  $\alpha$ -спираль, построенная из остатков L-аминокислот, сама по себе является асимметричной структурой (фиг. 17). Следовательно, асимметричность спирали, так же как асимметричность каждого аминокислотного остатка в отдельности, будет вносить вклад в общее оптическое вращение.

Путем измерения этих физических свойств удалось показать, что упомянутые синтетические полипептиды могут существовать в  $\alpha$ -спиральной конфигурации не только в волокнах, но и в растворе (фиг. 22). Более того, при соответствующем изменении физических условий (например, при изменении температуры или замене растворителя)  $\alpha$ -спиральная конфигурация может быть разрушена. Когда высокомолекулярный синтетический полипептид, например ПБЛГ, нагревают в растворителе, в котором  $\alpha$ -спиральная конформация устойчива при комнатной температуре, переход спиральной структуры в неспиральную (по-видимому, хаотическую) происходит довольно резко (в узком интервале температур). Такие явления можно проследить на примере какого-либо физического свойства, зависящего от макромолекулярной конформации, скажем на примере оптического вращения или вязкости. Приведенные на фиг. 23 графики по своему виду напоминают графики плавления кристаллических веществ. Этот тип зависимости характерен для кооперативных процессов. Иначе говоря, разрушение одного участка спиральной структуры способствует разрушению всей спирали. Кооперативность процесса разрушения  $\alpha$ -спирали может быть предсказана, так как атом кислорода карбонильной группы и пептидный атом азота, принадлежащие одному аминокислотному остатку полипептида, связаны водородными связями с сопряженными донорными NH-группами и акцепторными атомами кислорода в двух разных участках молекулы (т. е. связи атомов кислорода с NH-группами направлены книзу, а связи, идущие от NH-групп к акцепторным атомам



А. Зависимость удельного вращения (f<sub>n</sub>) от температуры (t) для полипептида (ПБЛГ) в спиральной конформации. Б. Температура разрушения спиральной конформации.





Фиг. 23. Переходы спираль—клубок.

А. Зависимость удельного вращения поли-L-глутаминовой кислоты (I) и поли-L-лизина (II) от pH (обратите внимание на резкость перехода). Б. Переход спираль—клубок как функция температуры для миоглобина кашалота. Доля спиральных участков  $f_h$  рассчитывается по результатам измерения оптического вращения раствора белка при разных температурах.



кислорода, — кверху; см. модель на фиг. 17). Примерно семь ковалентно связанных аминокислотных остатков разделяют два крайних донорных и акцепторных атома, участвующих в образовании пары водородных связей с каким-либо одним CO—NH-звеном в середине цепи. Разрыв одной водородной связи не нарушает целостность спирали. Разрыв трех соседних водородных связей разрушает один виток спирали, что в свою очередь ведет к разрушению спиральных структур, стабилизированных остатками, которые предшествуют этому неспирализованному участку или следуют за ним. Кооперативные структурные переходы обычны для белков в растворе. Вспомним, например, денатурацию яичного белка, почти мгновенно происходящую при температуре, близкой к точке кипения воды.

После обнаружения  $\alpha$ -спиральной конформации в волокнах синтетических полипептидов было затрачено немало усилий на изучение различных синтетических полипептидов с целью установить, свойственна ли  $\alpha$ -спираль всем белкам, и если нет, то в какой мере структура того или иного полипептида зависит от природы его боковых цепей (проведению этих исследований способствовало появление методов, дающих возможность определять структуру белков в растворе). При рассмотрении молекулярных моделей становится ясно, что определенные типы остатков не могут существовать в  $\alpha$ -спиральной конфигурации. Например, полипептид, состоящий из рацемической смеси D- и L-аминокислот, не может образовать  $\alpha$ -спираль, так как в данном случае каждая R-группа (в зависимости от того, имеет ли аминокислота L- или D-конфигурацию) находилась бы либо под, либо над плоскостью, проходящей через  $\alpha$ -углеродный атом перпендикулярно к оси спирали (фиг. 17). Сильное электростатическое отталкивание должно возникать в тех местах, где D-остаток совпадет с L-остатком, расположенным под ним или над ним (по направлению оси спирали) на расстоянии одного витка. Это предположение было подтверждено, когда удалось показать, что полипептид поли-DL-аланин ни при каких условиях не образует  $\alpha$ -спирали, тогда как поли-L-аланин полностью

спиральной  
межпептид  
В те  
аминокислот  
пептидных  
ма должен  
фиг. 24. Э  
чается от у

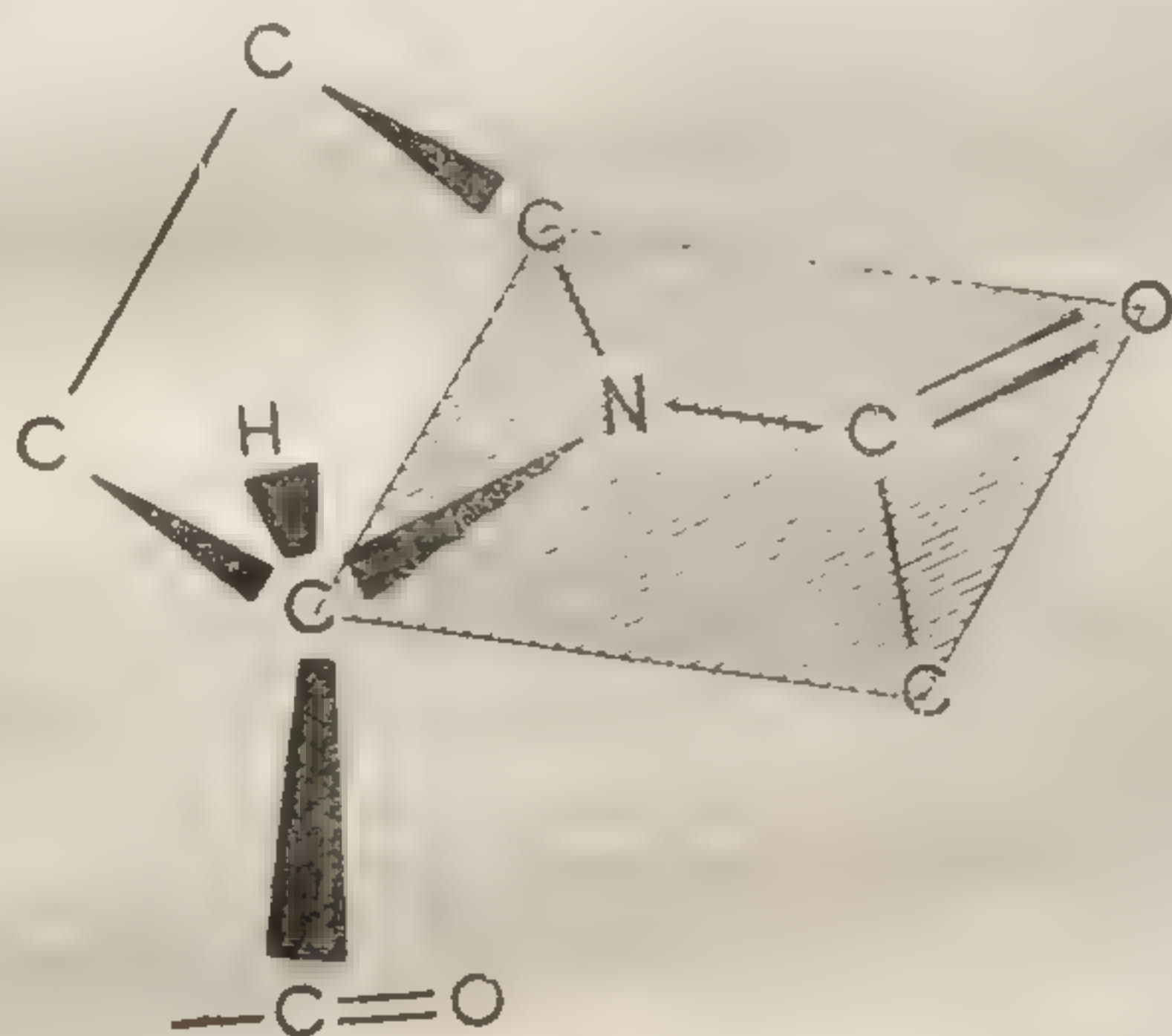
Фиг. 24. I

Поэтому во  
стоит прол  
вследствие  
щения вокр  
Большин  
Если в  $\beta$ -по  
дикалы, то  
шается. Есл  
группе заме  
радиусом, ка  
то возникает  
прикосновен  
родном атом  
та цепи. Это  
Данные  
тидов, содер  
остатков, пр



спирализован как в растворителях, не разрушающих межпептидных водородных связей, так и в волокне.

В тех местах, где в полипептидной цепи встречается аминокислота пролин, угол между плоскостями двух пептидных остатков по обе стороны  $\alpha$ -углеродного атома должен быть жестко фиксирован, как показано на фиг. 24. Этот фиксированный (двугранный) угол отличается от угла, требуемого  $\alpha$ -спиральной конфигурацией.



Фиг. 24. Конфигурация остатка L-пролина в пептидной цепи.

Поэтому во всех тех местах, где в полипептидной цепи стоит пролин,  $\alpha$ -спиральная конформация обрывается вследствие того, что химические связи не допускают вращения вокруг связи  $N-C-\alpha$  (фиг. 15).

Большинство аминокислот содержит  $\beta$ - $CH_2$ -группу. Если в  $\beta$ -положениях (фиг. 17) стоят только  $-CH_2R$ -радикалы, то геометрическая структура спирали не нарушается. Если же один из водородных атомов в  $\beta$ - $CH_2$ -группе замещен группой с бóльшим вандерваальсовым радиусом, как в аминокислотах изолейцине или валине, то возникает значительное отталкивание вследствие соприкосновения между вторым заместителем при  $\beta$ -углеродном атоме и соседними атомами  $\alpha$ -спирального хребта цепи. Это снижает устойчивость спирали.

Данные по структуре ряда синтетических полипептидов, содержащих только один тип аминокислотных остатков, приведены в табл. 10. Из этой таблицы видно,



что некоторые остатки совместимы с  $\alpha$ -спиралью (и в действительности стабилизируют ее), тогда как другие стремятся ее разрушить.  $\alpha$ -Спираль может быть неустойчивой по двум разным причинам. Во-первых, характер взаимодействия боковых цепей может быть таким, что образованию стабильной спирали будут препятствовать силы отталкивания того или иного типа, возникающие в процессе формирования спирали (например, в поли-L-изолейцине, поли-L-пролине, поли-L-глутамате<sup>-</sup>, поли-L-аспартате<sup>-</sup> и поли-L-лизине<sup>+</sup>). Во-вторых, неустойчивость может объясняться существованием альтернативной более устойчивой структуры. Так, в поли-L-серине образование водородных связей с участием гидроксильных групп серина приводит к структуре, более устойчивой, чем  $\alpha$ -спираль (в  $\alpha$ -спирали не все потенциальные водородные связи гидроксильных серина могут быть реализованы). В полиглицине нет ограничений, накладываемых  $\beta$ -углеродным атомом на конфигурацию пептидной цепи, в результате чего он склонен к образованию структур типа листа, в которых различные полипептидные молекулы скреплены межмолекулярными водородными связями.

В свете сказанного выше особого внимания заслуживают данные по поли-L-глутамату<sup>-</sup> и поли-L-лизину<sup>+</sup>. При изучении этих полимеров в водном растворе оказалось, что при таких значениях pH, при которых почти все (но не все!) карбоксильные или аминные группы не заряжены (pH  $\sim$  4 для полиглутаминовой кислоты и pH  $\sim$  10 для полилизина), полимеры остаются растворенными в воде и образуют устойчивые  $\alpha$ -спирали. В области нейтральных значений pH поли-L-глутамат<sup>-</sup> и поли-L-лизин<sup>+</sup> практически полностью заряжены (они несут соответственно один отрицательный или один положительный заряд на мономерный остаток). В  $\alpha$ -спирали эти заряды находились бы очень близко друг к другу (обратите внимание на близкое пространственное расположение групп, разделенных тремя или четырьмя ковалентными мономерными единицами). В более вытянутой конформации электростатическое отталкивание было бы меньшим. Поэтому ни один из этих полимеров (в полностью заряженном состоянии) не имеет спиральной

Таблица 10

Классификация  $\alpha$ -аминокислот по их влиянию на конформацию полипептидной цепи

Аминокислоты, образующие $\alpha$ -спираль	Боковая цепь $\alpha$ -аминокислоты	Боковая цепь $\alpha$ -аминокислоты	
		Аминокислоты, не образующие $\alpha$ -спирали	Из-за стерических препятствий
Аланин			



Таблица 10

Классификация  $\alpha$ -аминокислот по их влиянию на конформацию полипептидной цепи

Классификация α-аминокислот по их влиянию на конформацию полипептидной цепи			
Аминокислоты, образующие α-спираль	Боковая цепь α-аминокислоты	Аминокислоты, не образующие α-спирали	Боковая цепь α-аминокислоты
Из-за стерических препятствий			
Аланин	$-\text{CH}_3$	Валин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Глутаминовая кислота (нейтральная)	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{OH}$	Изолейцин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH} \\   \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$
		Треонин <sup>1)</sup>	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
По другим причинам			
Лейцин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{CH}_2-\text{CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Глицин	$\begin{array}{c} -\text{H} \\   \\ -\text{CH}_2-\text{OH} \\   \\ \text{N}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_2 \end{array}$
Лизин (нейтральный)	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Серин	
Метионин	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$	Пролин	
Фенилаланин	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	Глутамат (анион) <sup>2)</sup>	
Тирозин	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	Лизин (катион) <sup>2)</sup>	
		Аспартат (анион)	

<sup>1)</sup> Нестабильности спирали может способствовать образование водородных связей.

<sup>2)</sup> При таких значениях pH, при которых средний заряд на остаток  $< 0,3$ , эти остатки также могут быть «спиралеобразующими».



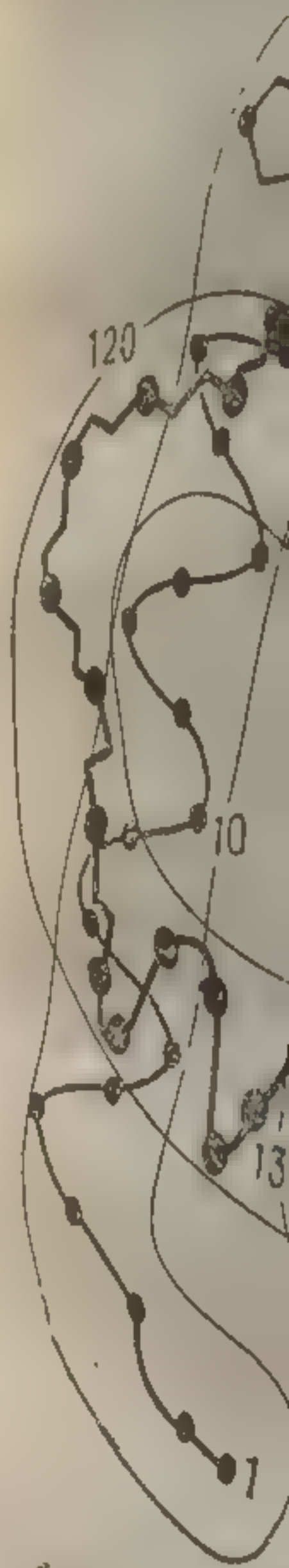
конформации в водном растворе при нейтральном значении pH. В отсутствие таких сильных специфических сил отталкивания (слабокислые растворы полиглутамата и слабощелочные растворы полилизина)  $\alpha$ -спирали устойчивы даже в водном растворе, где сами молекулы растворителя служат активными донорами и акцепторами водородных связей. Этот экспериментальный результат, по-видимому, опровергает утверждение, что  $\alpha$ -спиральная конформация, предложенная Полингом и Кори для твердых (фибриллярных) полипептидов, не может оставаться интактной в водном растворе.

Основываясь на изучении конформации различных синтетических полипептидов, мы можем по известному аминокислотному составу белка провести приближенную оценку степени его спирализации. Мы можем также оценить конформацию белка, сравнивая значение какого-либо параметра, обусловленного спиральной структурой белка, с его значением у полностью спирализованного синтетического полипептида. Конформация белка целиком определяется специфической последовательностью аминокислот в полипептидной цепи. Отдельные участки полипептида будут иметь специфическую структуру, зависящую как от последовательности остатков аминокислот в данном участке, так и от *внутри- и межмолекулярных* взаимодействий между этим и другими участками белковой молекулы<sup>1</sup>.

Дальнейшие предсказания о структуре белка будут основываться главным образом на той информации, которую удастся получить при изучении трехмерной структуры белков с известной последовательностью аминокислот. Трехмерная структура полипептида с определенной последовательностью (белка) определена в настоящее время с разрешением, близким к атомному, для пяти бел-

<sup>1</sup> Хотя трехмерная структура молекулы белка определяется ее первичной структурой (последовательностью аминокислот), пока не найдено перспективных подходов к предсказанию конформаций молекулы на основании известной первичной структуры полипептидной цепи белка. Это естественно, если принять во внимание чрезвычайно многообразие возможных взаимодействий с участием множества боковых цепей и кооперативную природу этих взаимодействий. — Прим. ред.

ков — модель  
используя метод  
излучения кристаллов

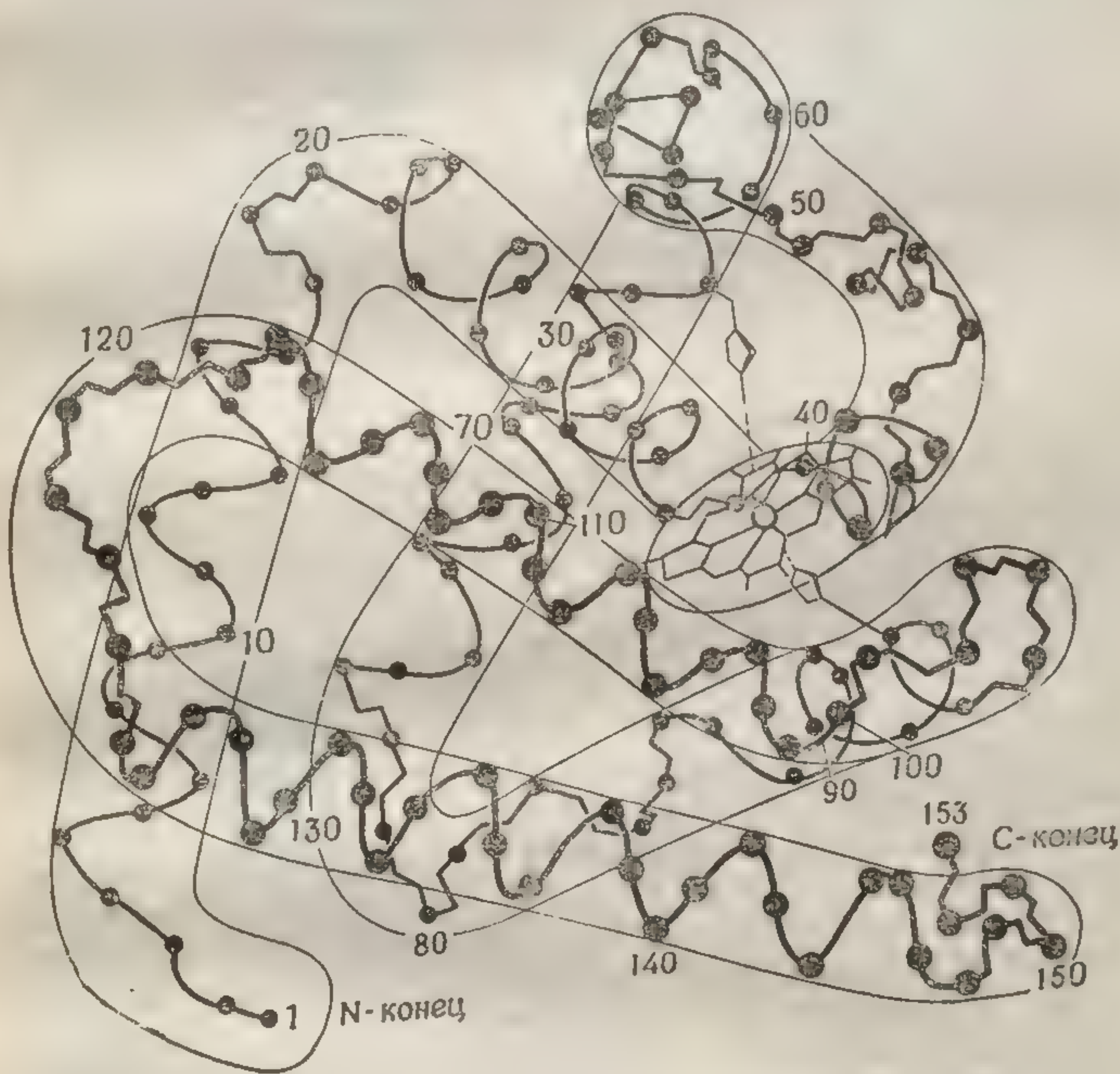


Фиг. 25. Схематическая модель

полную трехмерную  
структуру молекулы  
фиг. 25. Перути  
сталлографический  
белок — гемоглобин  
белка разрешен  
времени только  
дату химии



ков — миоглобина, гемоглобина, лизоцима яичного белка, рибонуклеазы и химотрипсина. Кендрию с сотрудниками, используя метод дифракции рентгеновских лучей для изучения кристаллов миоглобина, впервые определил



Фиг. 25. Схема конформации пептидной цепи миоглобина.

полную трехмерную структуру молекулы белка. Схематическая модель молекулы миоглобина изображена на фиг. 25. Перутц с сотрудниками детально изучил кристаллографическими методами функционально близкий белок — гемоглобин. Ввиду большой сложности этого белка разрешение его структуры доведено к настоящему времени только до расстояний, несколько превышающих длину химической связи (см. ниже).



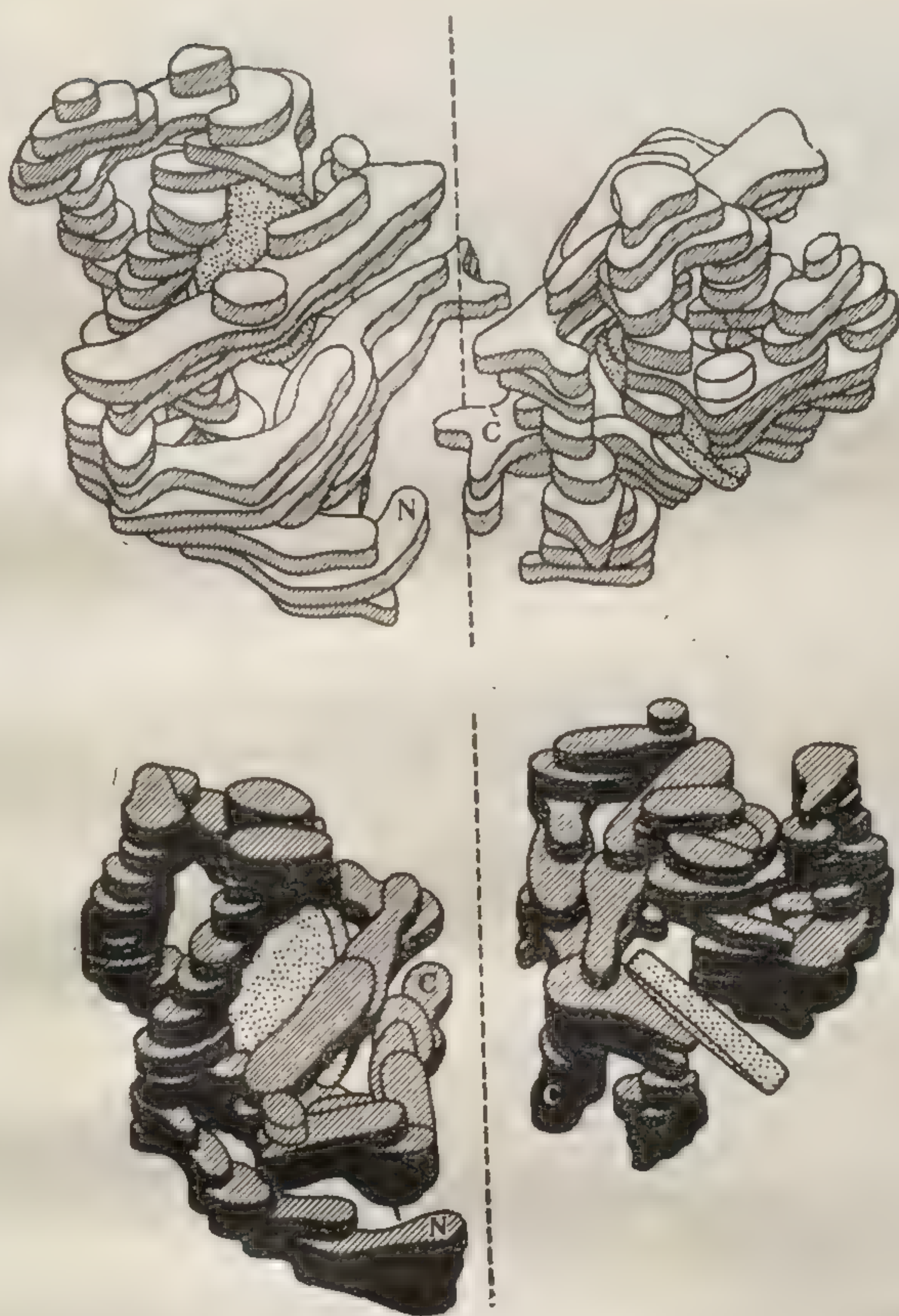
#### 4. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АМИНОКИСЛОТ И СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

При измерении той доли от общего числа аминокислотных остатков миоглобина, которая приходится на участки с  $\alpha$ -спиральной конформацией, были получены данные, удивительно хорошо совпадающие с предсказаниями, сделанными на основании физических измерений в водных растворах (в особенности измерений дисперсии оптического вращения). Хотя молекула миоглобина почти на 70% состоит из  $\alpha$ -спиралей, неспирализованные участки имеются во многих частях полипептидной цепи. Иначе говоря, длина какого-либо отдельного спирализованного участка никогда не составляет большой доли всей аминокислотной последовательности. Можно было бы предположить, что различные перегибы и повороты полипептидной цепи возникают вследствие своеобразия последовательности аминокислотных остатков в молекуле миоглобина. Удивительно, однако, что полипептидные компоненты структурно более сложной молекулы гемоглобина, состоящей из четырех «миоглобиноподобных» полипептидных цепей двух разных типов (фиг. 26), по своей форме чрезвычайно напоминают полипептидную цепь миоглобина. Трехмерная структура молекулы гемоглобина была определена с разрешением, которое позволяет сравнивать трехмерную форму полипептидных цепей гемоглобина и миоглобина, но не позволяет точно определить положение индивидуальных атомов в молекуле гемоглобина. Два разных полипептидных компонента гемоглобина и полипептидная цепь миоглобина содержат примерно одинаковое число аминокислотных остатков. И хотя точная последовательность аминокислот в этих полипептидных цепях различна, ряд сходных черт бросается в глаза (примером может служить расположение остатков пролина, на которых спираль обрывается).

Рассмотрение тех немногих белков, для которых известна последовательность и структура, дает основание предположить, что многие изменения в последовательности аминокислотных остатков не влекут за собой никаких существенных изменений в конформации макромо-

Фиг. 26. К  
лекулы. Изуч  
воду, что, хот  
но возможные  
ствиями, опре  
лекулы, явля  
модействия, с  
В настоящ  
нокислотных  
ферментов





Фиг. 26. Конформация полипептидных цепей гемоглобина.

лекулы. Изучение структуры многоглобина приводит к выводу, что, хотя в ней реализованы почти все потенциально возможные водородные связи, основными взаимодействиями, определяющими трехмерную конформацию молекулы, являются (помимо ковалентных связей) взаимодействия, обусловленные дисперсионными силами.

В настоящее время полная последовательность аминокислотных остатков известна лишь для очень немногих ферментов (гл. VIII). Последовательности остатков



в том участке фермента, который ответствен за катализ, изучались более интенсивно. При помощи специфических химических реагентов у многих ферментов можно «пометить» особую область — *активный центр*. Общий принцип, лежащий в основе этого метода, описан в разд. 2 и 3, а также в гл. V. «Меченый» белок можно затем расщепить на короткие полипептидные фрагменты и определить последовательность ковалентно связанных аминокислот во фрагментах, содержащих метку. В табл. 11 для некоторых ферментов приведены последовательности аминокислот в отрезках цепи, содержащих часть активного центра.

Специально отмечены те остатки аминокислот, которые нарушают или исключают образование  $\alpha$ -спирали. По своему аминокислотному составу ни одна из этих последовательностей не характерна для участков со спиральной конформацией. Этот результат вовсе не удивителен. Для того чтобы выполнять свои специфические функции, активный центр должен иметь специфическую геометрическую конформацию. Маловероятно, чтобы такие высокоспециализированные функции могли удовлетворительно выполняться регулярной структурой, каковой является  $\alpha$ -спираль. Можно ожидать, что активный центр будет иметь строго определенную, но уникальную конформацию. Предполагают, что уникальная конформация может быть обусловлена особой последовательностью аминокислотных остатков в этом участке полипептидной цепи. Так, многие протеолитические ферменты имеют одну и ту же последовательность в активном центре, а именно -Гли-Асп-Сер-Гли. Очень наглядным примером может служить в этом отношении фермент глицеральдегидфосфатдегидрогеназа. Выделены два таких фермента, осуществляющих одну и ту же каталитическую реакцию, — один из дрожжей, другой из мышц кролика. Несмотря на то что аминокислотный состав этих ферментов различен, последовательность аминокислот в области активного центра у них одинакова (по крайней мере на протяжении 18 остатков). Этот результат кажется особенно удивительным в свете того факта, что при выделении белков с высокоспециализированными функциями из ряда близкородственных орга-



Таблица 11

Последовательность ковалентно связанных аминокислот в активном центре ряда ферментов <sup>1)</sup>

Химотрипсин	$  \begin{array}{c}    \\  S \\    \\  \text{Цис}^* - \text{Мет} - \text{Гли}^* - \text{Асп}^* - \underline{\text{Сер}^*} - \text{Гли}^* - \text{Гли}^* - \text{Про}^* - \text{Лей} - \text{Вал}^* - \text{Цис}^* \\    \\  S \\     \end{array}  $	$  \begin{array}{c}    \\  S \\    \\  \text{Цис}^* - \text{Мет} - \text{Гли}^* - \text{Асп}^* - \underline{\text{Сер}^*} - \text{Гли}^* - \text{Гли}^* - \text{Про}^* - \text{Лей} - \text{Вал}^* - \text{Цис}^* \\    \\  S \\     \end{array}  $
Трипсин	$  \begin{array}{c}    \\  S \\    \\  \text{Цис}^* - \text{Глун} - \text{Гли}^* - \text{Асп}^* - \underline{\text{Сер}^*} - \text{Гли}^* - \text{Гли}^* - \text{Про}^* - \text{Вал}^* - \text{Вал}^* - \text{Цис}^* \\    \\  S \\     \end{array}  $	$  \begin{array}{c}    \\  S \\    \\  \text{Цис}^* - \text{Глун} - \text{Гли}^* - \text{Асп}^* - \underline{\text{Сер}^*} - \text{Гли}^* - \text{Гли}^* - \text{Про}^* - \text{Вал}^* - \text{Вал}^* - \text{Цис}^* \\    \\  S \\     \end{array}  $
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	Илей* - Вал* - Сер* - Аспн - Ала - Сер* - <u>Цис</u> - Тре* - Тре* - Аспн - Цис	
Алкогольдегидрогеназа дрожжей	Вал* - Ала - Тре* - Гли* - Илей* - <u>Цис</u> - Арг* - Сер* - Асп* - Асп* - Гис - Ала	
Щелочная фосфатаза	Лиз* - Про* - Асп* - Тир - Вал* - Тре* - Асп* - <u>Сер</u> * - Ала - Ала - Сер* - Ала	
Фосфоглюкомутаза	Гли* - Вал* - Тре* - Ала - <u>Сер</u> * - Гис - Асп* - Гли* - Глу* - <u>Сер</u> * - Ала - Гли*	
Ацетоацетатдекарбоксилаза	Глу* - Лей - Сер* - Ала - Тир - Про* - <u>Лиз</u> * - Лиз* - Лей	
3-глицерофосфатаальдолаза	Гли* - Тре* - Лей - Лей - <u>Лиз</u> * - Аспн - Про* - Мет - Вал* - Тре* - Про* - Гли*	
Глутамат-аспартат-трансаминаза	Глу* - (Ала, Асп*, Гли*, Илей*, <u>Лиз</u> *) <sup>2)</sup> - Гли* - Сер* - Асп - Фен	
Трипсин	$  \begin{array}{c}  \text{Гис} - \text{Фен} - \text{Цис}^* - \text{Гли}^* - \text{Гли}^* - \text{Сер}^* - \text{Лей} - \text{Илей}^* - \text{Аспн} - \text{Сер}^* \\    \\  \text{Цис}^* - \underline{\text{Гис}} - \text{Ала} - \text{Ала} - \text{Сер}^* - \text{Вал}^* - \text{Вал}^* - \text{Три}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{Глу} \\  \text{Глу}  \end{array}  $

<sup>1)</sup> Подчеркнуты остатки, про которые известно, что они осуществляют каталитическое действие. Звездочками отмечены остатки, которые нарушают спиральную структуру табл. 10.

<sup>2)</sup> В скобках приведены остатки, последовательность которых еще не определена.



низмов часто обнаруживаются различия в последовательности аминокислот. Сошлемся на пример инсулина. В молекуле этого белкового гормона имеется участок (длинной также около двух десятков аминокислот), в котором обнаружены вариации: в бычьем инсулине и в инсулине овцы и свиньи последовательность аминокислот в этом участке не вполне одинакова. Выявлены также различия в полипептидных цепях аномальных гемоглобинов, гемоглобина плода и многоглобина. Общая последовательность по крайней мере 18 аминокислот в молекулах глицеральдегидфосфатдегидрогеназы из дрожжевых клеток и из мышц кролика должна отражать высокую специфичность химической функции этого участка полипептидной цепи. Видимо, замены в нем невозможны без ущерба для функции<sup>1</sup>.

## ЛИТЕРАТУРА

- Pauling L., The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed., Cornell University Press, Ithaca, New York, 1960.
- Pauling L., Corey R. B., Branson H. R., The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain, Proc. Nat. Acad. Sci., **37**, 205 (1951).
- Perutz M. F., Proteins and Nucleic Acids: Structure and Function, Elsevier, Amsterdam, 1962.
- Crick F. H. C., Kendrew J. C., X-Ray Diffraction and Protein Structure, Advan. Protein Chem., **12**, 133 (1957).
- Cochran W., Crick F. H. C., Vand V., The Structure of Synthetic Polypeptides, I. The Transform of Atoms on a Helix, Acta Cryst., **5**, 581 (1952).
- Perutz M. F., The Hemoglobin Molecule, Scientific American, November, 1964.
- Kendrew J. C., Myoglobin and the Structure of Proteins, Science, **139**, 1259 (1963).
- Schoemaker D. P., Donohue J., Schoemaker V., Corey R. B., The Structure of L-Threonine, J. Am. Chem. Soc., **72**, 2328 (1950).
- Kauzmann W., Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation, Advan. Protein Chem., **14**, 1 (1959).
- Kopple K. D., Peptides and Amino Acids, Benjamin, New York, 1966.
- Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins (Stahman M. A., editor), University of Wisconsin Press, 1962.

<sup>1</sup> Этот вопрос (об аналогиях и различиях в аминокислотных последовательностях как активных центров, так и других участков молекулы у ферментов, сходных по своей функции) излагается здесь очень упрощенно, без надлежащего учета закономерностей биохимической эволюции строения белков. — Прим. ред.

КИНЕТИКА  
И ФОРМ

Прежде чем  
действия ферме  
ным подходом  
Таким подходе  
ческой кинетик  
рованы многи  
Строгое матем  
тивных реакци  
сопоставление  
не невозможно  
ские уравнени  
рые ограничит  
о характере с  
можно упустит  
катализа при  
ских уравнени  
В этой главе  
мальных моде  
бирования, а  
той или иной  
необходим для  
согласуется ли  
с кинетическим  
эксперименте.  
кинетики той  
стоит в том, ч  
разом информ  
низма дейст



## ГЛАВА IV

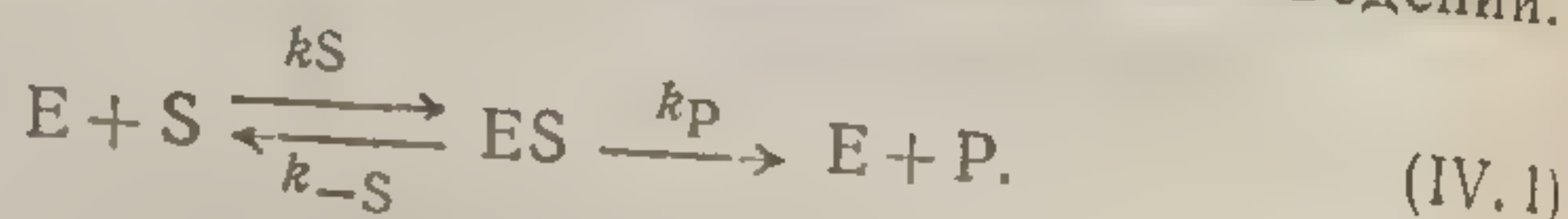
# КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ И ФОРМАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ КАТАЛИЗА

Прежде чем рассматривать молекулярные механизмы действия ферментов, мы познакомимся с более формальным подходом к изучению фермент-субстратных систем. Таким подходом является изучение их с позиций химической кинетики, на основании которого были постулированы многие механизмы ферментативных реакций. Строгое математическое описание кинетики ферментативных реакций настолько сложно, что аналитическое сопоставление теории и эксперимента оказывается если не невозможным, то весьма затруднительным. Кинетические уравнения часто можно упростить, сделав некоторые ограничительные допущения (частные или общие) о характере системы. Однако следует учесть, что легко можно упустить из виду вполне вероятные механизмы катализа при попытке избежать сложных математических уравнений, которые необходимы для их описания. В этой главе будет приведен ряд наиболее общих формальных моделей ферментативного катализа и его ингибирования, а также указаны критерии применимости той или иной модели. Математический анализ моделей необходим для того, чтобы иметь возможность проверить, согласуется ли предполагаемый молекулярный механизм с кинетическими свойствами системы, наблюдаемыми в эксперименте. Главная цель исследования химической кинетики той или иной фермент-субстратной системы состоит в том, чтобы использовать полученную таким образом информацию для понимания молекулярного механизма действия фермента.



## 1. РАВНОВЕСИЕ И СТАЦИОНАРНОЕ СОСТОЯНИЕ

Вернемся к простой модели взаимодействия фермента с субстратом в реакции, обсуждавшейся во введении:



Для формального описания поведения многих фермент-субстратных систем (особенно на ранней стадии реакции, пока не накопилось значительного количества продукта) модель, выраженная уравнением (IV.1), вполне достаточна. Она приводит к математическому выражению, из которого может быть определена скорость реакции при условии, что общая концентрация фермента  $E_0$  намного меньше начальной концентрации субстрата  $S_0$ ; это условие обычно удовлетворяется в эксперименте. Измеряемой переменной является, как правило, либо концентрация субстрата  $[S]$ , либо концентрация продукта  $[P]$ . Если упомянутое выше условие, т. е.  $S_0 \gg E_0$ , соблюдено, то малой концентрацией  $ES$  можно пренебречь по сравнению с изменениями  $[S]$  или  $[P]$ . Тогда (поскольку  $[P] = S_0 - [S] - [ES] \approx S_0 - [S]$ ) скорость реакции будет выражаться уравнением

$$\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_P [ES]. \quad (IV.2)$$

Подстановка в уравнение (IV.2) выражения для скорости реакции относительно  $S$ , вытекающего из принятой модели (IV.1), дает уравнение

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_S [E] [S] - k_{-S} [ES] = k_P [ES]. \quad (IV.3)$$

Следовательно, концентрацию промежуточного фермент-субстратного комплекса можно найти из уравнения

$$[ES] = \frac{E_0 [S]}{\{(k_{-S} + k_P)/k_S\} + [S]}, \quad (IV.4)$$

где  $E_0$  — общая концентрация активных центров фермента, равная  $[ES] + [E]$ . Подставляя (IV.4) в (IV.2), мы получаем уравнение (IV.5), которое обычно называют



уравнением Михаэлиса — Ментен или уравнением Анри:

$$\frac{d[P]}{dt} = v = \frac{k_p E_0 [S]}{K_M + [S]}, \quad (IV. 5)$$

где  $K_M = (k_{-s} + k_p)/k_s$  — константа Михаэлиса.

Уравнение (IV. 5) применимо к любым фермент-субстратным системам, каталитические реакции в которых протекают в соответствии с формальной моделью (IV. 1), если только общая концентрация фермента достаточно мала, чтобы удовлетворялось уравнение (IV. 2).

Отметим, что скорость изменения  $[ES]$  во времени определяется выражением

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_s [E] [S] - (k_{-s} + k_p) [ES],$$

и, следовательно, из уравнения (IV. 3) вытекает, что

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0.$$

Поскольку  $E_0 = [E] + [ES]$ , то и  $d[E]/dt = 0$ . Это условие общеизвестно как условие *стационарного состояния*. Когда начальные концентрации субстрата и измеряемые концентрации продукта значительно превосходят общую концентрацию фермента ( $E_0$ ); предположение о стационарности (по отношению к молекулам фермента) вполне правомерно. Как мы увидим далее, многое в ферментативной кинетике зависит от правомерности этого предположения.

Уравнение (IV. 4) определяет *стационарную* концентрацию комплекса  $ES$ . Если *равновесие* между субстратом, находящимся в растворителе, и субстратом, связанным с активным центром фермента, устанавливается быстро по сравнению со скоростью превращения  $ES$  ( $k_{-s} > k_p$ ), то в ходе реакции достигается *равновесная* концентрация комплекса  $ES$ . Эта концентрация определяется уравнением

$$[ES]_{\text{равн}} = \frac{[S]}{(k_{-s}/k_s) + [S]}. \quad (IV. 6)$$

Следует отметить, что для справедливости уравнения (IV. 4) достаточно лишь поддерживать концентрации на определенном экспериментально контролируемом уровне. Уравнение же (IV. 6) будет справедливо только в том



случае, если между инвариантными кинетическими параметрами случайно существуют определенные соотношения. При условии  $k_{-s} \gg k_p$  уравнение (IV.4) сводится к уравнению (IV.6). Это последнее условие удовлетворяется или не удовлетворяется в зависимости от природы комплекса, обозначенного нами как ES. Если, например, в формировании комплекса участвуют только слабые взаимодействия, подобные тем, которые обусловлены, например, дисперсионными силами, действующими между комплементарными молекулами (разд. 2 гл. II), то очень вероятно, что скорость диссоциации комплекса будет велика, так как для этого необходим разрыв только этих слабых (обладающих малой энергией) связей. Распад комплекса с образованием продуктов реакции сопровождается образованием и разрывом химических связей. Поскольку химические процессы требуют тесного сближения атомов с преодолением зоны сильного межэлектронного отталкивания, для них, как правило, характерны высокие энергии активации и вследствие этого меньшие скорости. В этом случае уравнения (IV.4) и (IV.6) эквивалентны, так как  $k_{-s} \gg k_p$ . Однако формирование комплекса ES может сопровождаться образованием химических связей между молекулами фермента и субстрата. В этом случае константа  $k_{-s}$  может оказаться меньше, чем константа  $k_p$ , или будет величиной того же порядка и тогда будет справедливо уравнение (IV.4), но не (IV.6). Более детальное знакомство с фермент-субстратными системами поможет уяснить разницу между допущением о стационарности [уравнение (IV.4)] и о равновесности [уравнение (IV.6)] процессов.

В простейшей модели (IV.1) математическая форма кинетических уравнений не зависит от того, принято ли допущение о равновесности или о стационарности процесса. Однако физический смысл константы  $K$  зависит от того, какое из этих допущений справедливо.

## 2. ОБРАТИМЫЕ И НЕОБРАТИМЫЕ РЕАКЦИИ

Для простоты начнем обсуждение с кинетики модельных реакций, протекающих почти стехиометрически до завершения. Такие реакции называют «необратимыми»,

хотя в действительности обратимости процесса, как правило, не существует. Микроскопическим допущением о равновесии на основе принципа в качестве системы, описывающей что концентрация реагентов с концентрацией продуктов делиться выражением

По определению константы скорости и скорости как равной нулю. (IV.1)

Отсюда следует, что в равновесии также абсурдный результат, в модели обратимости.  $ES \rightarrow E + P$ , путь, как E, должен быть

Применяя закон сохранения массы, получаем следующее уравнение для продукта:

$$\frac{d[P]}{dt} =$$



хотя в действительности любая реакция в какой-то степени обратима. Принципиальная обратимость химических процессов выражена в законе *микроскопической обратимости*, который гласит, что «пути прямой и обратной химической реакции всегда совпадают».

Микроскопическая обратимость является обязательным допущением при выводе законов химического равновесия на основе кинетических соображений. Рассмотрим в качестве иллюстрации модельную реакцию систему, описываемую уравнением (IV. 1). Допустим, что концентрация фермента чрезвычайно мала по сравнению с концентрацией субстрата. Тогда скорости образования продукта и исчезновения субстрата будут определяться выражениями

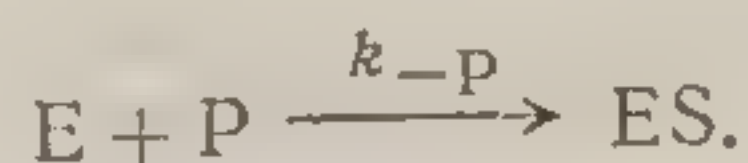
$$-\frac{d[S]}{dt} = k_s [E][S] - k_{-s} [ES],$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_p [ES].$$

По определению в точке равновесия концентрации субстрата и продукта более не меняются, т. е. наблюдаемая скорость каждого из этих двух процессов становится равной нулю. Следовательно, в соответствии с моделью (IV. 1)

$$[ES] \text{ (при равновесии)} = 0.$$

Отсюда следует, что концентрация субстрата при равновесии также должна была бы быть равной нулю! Этот абсурдный результат получается потому, что, строго говоря, в модели (IV. 1) нарушен закон микроскопической обратимости. Если продукт образуется по пути  $ES \rightarrow E + P$ , то, значит, должен существовать и такой путь, как  $E + P \rightarrow ES$ . Следовательно, корректная модель должна включать и эту обратную реакцию



Применяя закон микроскопической обратимости, получаем следующее выражение для скорости образования продукта:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_p [ES] - k_{-p} [P][E] = 0 \text{ (при равновесии)}. \quad (IV. 7)$$



Подстановка конечной (хотя, возможно, очень низкой) концентрации ES в это выражение дает

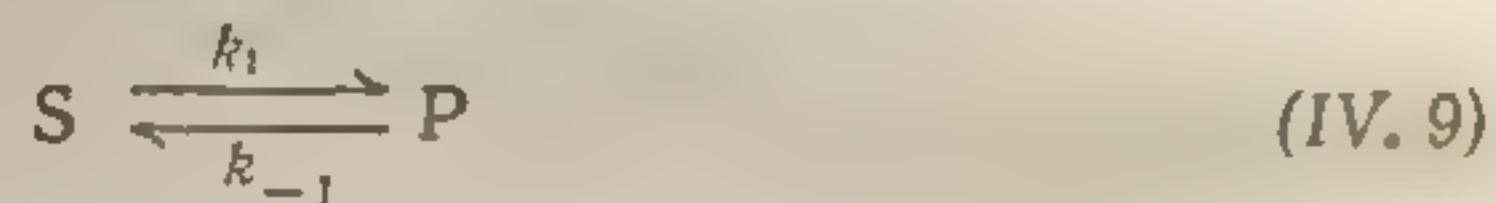
$$-\frac{d[S]}{dt} \text{ (при равновесии)} = 0 = k_S [E] [S] - \frac{k_{-S} k_{-P}}{k_P} [E] [P].$$

Отсюда получается обычное выражение химического равновесия.

$$\frac{[P]_{\text{равн}}}{[S]_{\text{равн}}} = \frac{k_S k_P}{k_{-S} k_{-P}} = K_{\text{равн}}. \quad (\text{IV. 8})$$

Отметим, что если  $[P]_{\text{равн}} \gg [S]_{\text{равн}}$ , то из уравнения (IV. 8) следует, что во всех случаях  $k_S k_P \gg k_{-S} k_{-P}$ , но не обязательно  $k_P \gg k_{-P}$ .

Катализатор (E) может увеличить только скорость, с которой устанавливается равновесие. Какой-либо более эффективный катализатор,  $E'$ , увеличивающий, скажем,  $k_P$ , по закону микроскопической обратимости будет также увеличивать в соответствующее число раз и  $k_{-P}$ . Поэтому отношение  $k_P/k_{-P}$  и, следовательно,  $K_{\text{равн}}$  останутся неизменными. Реакция превращения субстрата в продукт



может протекать даже и в отсутствие катализатора, и, хотя скорость, с которой она приближается к равновесию, может быть чрезвычайно низкой по сравнению со скоростью катализируемой реакции, равновесие в конце концов все же установится. В отсутствие катализатора условие равновесия имеет вид

$$\frac{[P]_{\text{равн}}}{[S]_{\text{равн}}} = \frac{k_1}{k_{-1}}.$$

Если в катализируемой реакции концентрация фермента очень низка по сравнению как с  $[S]_{\text{равн}}$ , так и с  $[P]_{\text{равн}}$  и (или) если комплекс ES настолько нестабилен, что его концентрация никогда не становится сравнимой с  $[S]$  или  $[P]$ , то концентрация фермента (или комплекса ES) не нарушит существенно условия равновесия.

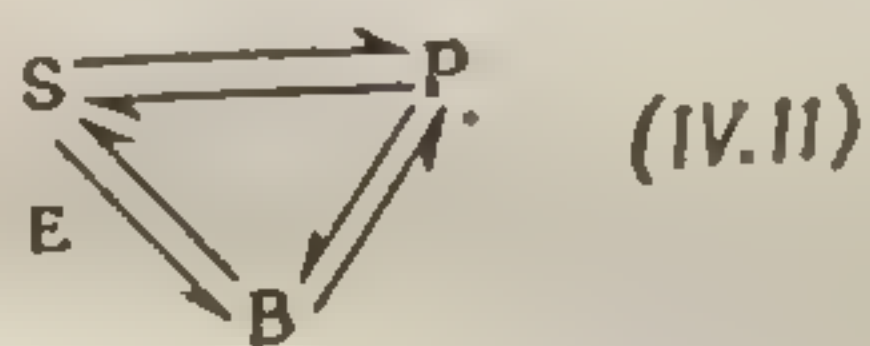


Оба пути реакции будут термодинамически тождественны

$$\frac{k_1}{k_{-1}} \equiv \frac{k_S k_P}{k_{-S} k_{-P}}. \quad (\text{IV.10})$$

Хотя обе кинетические константы скорости некатализируемой реакции [уравнение (IV.9)] могут значительно отличаться от любой кинетической константы скорости катализируемой реакции, а именно будут несравнимо меньшими, определенные соотношения между ними, устанавливаемые уравнением (IV.10), должны соблюдаться. Так как кинетические константы скорости инвариантны по отношению к концентрациям реагентов и продуктов, то соотношения, выведенные из рассмотрения равновесия [уравнение (IV.10)], должны быть также справедливы на всем протяжении реакции.

Существенной особенностью почти всех ферментов является ограниченность и специфичность путей катализируемых ими реакций. Рассмотрим, например, систему, которая при равновесии и в отсутствие фермента состоит только из реагентов и продуктов [уравнение (IV.9)]. Фермент-катализатор может направить реакцию по совершенно новому пути, например по пути, на котором происходит быстрое образование промежуточного продукта В:



При этом фермент будет обязательно катализировать и обратную реакцию ( $B \rightarrow S$ ). Если действие катализатора ограничивается этими двумя стадиями и если скорость на ферментативном пути реакции намного больше, чем на каждом некатализируемом пути ( $S \leftrightarrow P$ ,  $B \leftrightarrow P$ ), то конечное равновесное распределение продуктов будет достигнуто со скоростью, определяемой скоростью некатализируемой реакции  $B \leftrightarrow P$ . Промежуточное соединение В может обладать даже меньшей реакционной способностью, чем S, и если это так, то в присутствии фермента равновесие будет достигаться



медленнее, чем без него. В таком случае промежуточный продукт может достигнуть стационарной концентрации, сохраняющейся в течение долгого времени. Для биологических систем подобные ситуации — скорее правило, чем исключение. В изолированной системе (IV.11) промежуточное соединение окажется «ловушкой» для молекул субстрата. В биологических системах эти промежуточные продукты используются для синтеза других молекул, в котором участвуют иные ферменты-катализаторы. Следует отметить, что скорость приближения к равновесию может снижаться ферментом только в том случае, если скорость образования промежуточного продукта  $V$  велика по сравнению со скоростью обратной реакции: иначе некатализируемая реакция  $S \rightarrow P$  лишь незначительно нарушится вследствие слабого оттока молекул субстрата на катализируемый ферментом путь реакции. В предположенной нами ситуации (где скорость катализируемых ферментом реакций намного больше, чем некатализируемых)  $S$  и  $V$  вскоре будут находиться практически в равновесии. Таким образом, переключение химической реакции на путь, ведущий через образование промежуточного соединения  $V$ , возможно только в том случае, если  $V$  обладает большей термодинамической стабильностью, чем первоначальный субстрат. Тем самым предполагается, что образование  $V$  энергетически выгодно, т. е. что имеется источник энергии, направляющий реакцию на этот путь.

### «Необратимые» реакции

Мы можем считать реакцию практически *необратимой*, если обратная реакция совершенно не изменяет концентрации субстрата или промежуточных фермент-субстратных комплексов на протяжении кинетических измерений. Простейшей моделью необратимой ферментативной реакции является модель Анри или Михаэлиса—Ментен [уравнение (IV.1)]. Эта модель правомерна, если в реакции участвует лишь один субстрат, что весьма редко встречается в ферментативных реакциях. Правда, часто один из двух (или более) субстратов присутствует в большом избытке. В подобных случаях

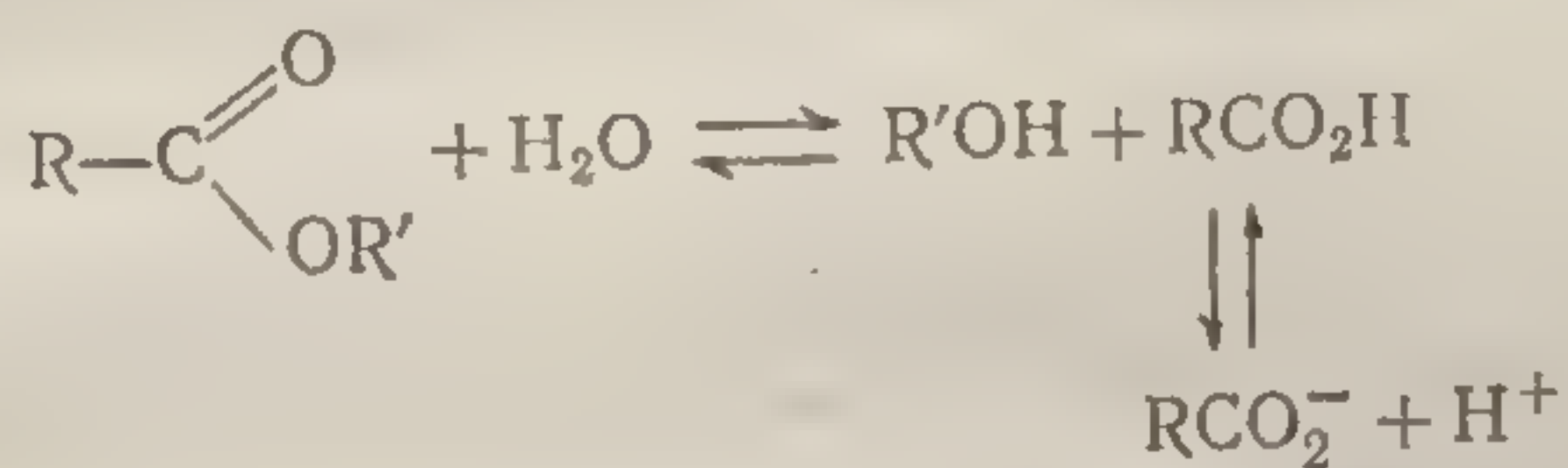
концентрация  
время реакции  
но, кинетика  
если бы это  
мером тако  
Притом эти  
социруют  
мы. Подоб  
мому пути  
сложных э  
практически  
близких к

Обратная  
к продукт  
протониро  
значитель  
трация во  
разовавшие  
с прямой  
реакции,  
няются тр  
согласуют  
одного су  
термодина  
страт.

Реакции  
продуктов  
нимыми, в  
вать как  
ются в от  
дуктов пр  
реакции. I  
ферментат  
часто осл



концентрация присутствующего в избытке реагента за время реакции меняется незначительно и, следовательно, кинетику формально можно анализировать так, как если бы этого реагента вообще не было; типичным примером такого рода реакций служат реакции гидролиза. При этом эти реакции часто дают продукты, которые диссоциируют при pH забуференной биологической системы. Подобная диссоциация приводит к квази необратимому пути реакции. Так, например, при гидролизе сложных эфиров образующаяся карбоновая кислота практически полностью диссоциирует при значениях pH, близких к нейтральному:



Обратная реакция требует как присоединения протона к продукту, так и присутствия спирта. Поскольку на протонирование в нейтральной зоне pH затрачивается значительное количество энергии и поскольку концентрация воды несоизмеримо больше концентрации образовавшегося спирта, обратная реакция по сравнению с прямой протекает очень медленно. Гидролитические реакции, катализируемые ферментами, обычно подчиняются требованиям модели Михаэлиса—Ментен. Часто согласуются с ней и реакции изомеризации с участием одного субстрата и одного продукта, когда продукт термодинамически значительно более стабилен, чем субстрат.

Реакции, при которых концентрации реагентов и продуктов в состоянии равновесия оказываются сравнимыми, в начальной стадии можно все же рассматривать как «необратимые» при условии, что они начинаются в отсутствие продуктов. По мере накопления продуктов приходится принимать во внимание и обратные реакции. Вследствие одной специфической особенности ферментативного катализа накопление продукта очень часто осложняет анализ кинетики ферментативных



реакций даже в квази необратимых системах. Эта особенность — так называемое *ингибирование продуктом*. Если соответствующим образом проанализировать этот процесс, такой анализ может привести к выяснению важных деталей природы активного центра фермента (см. ниже).

### 3. ИНГИБИРОВАНИЕ КАТАЛИЗА НЕОБРАТИМЫХ РЕАКЦИЙ

Необратимые однострубатные реакции представляют собой самые простые системы для изучения кинетики ферментов. В таких системах ценную информацию о природе активного центра фермента можно получить, изучая ингибирование ферментативного катализа другими (не вступающими в реакцию) молекулами. Можно представить себе две модели ингибирования специфических ферментативных реакций; они изображены на фиг. 27. В первой модели (фиг. 27, А) присутствие ингибитора препятствует доступу субстрата к активному центру фермента. При этом возможны три состояния активного центра —  $ES$ ,  $E$  и  $EI$ . Ингибирование этого типа при условии, что комплекс  $EI$  способен диссоциировать, называют *конкурентным ингибированием*. Согласно модели Михаэлиса—Ментен, скорость реакции в присутствии конкурентного ингибитора определяется уравнением (IV. 12), где  $K_I$  — константа диссоциации комплекса фермент—ингибитор ( $EI$ ).

$$\begin{aligned} E_0 &= [E] + [ES] + [EI], \\ E + S &\rightleftharpoons ES, \\ E + I &\rightleftharpoons EI, \\ ES &\xrightarrow{k_p} E + P, \\ [ES] &= \frac{E_0}{\{1 + (k_{-s}/k_s [S]) + (k_p/k_s [S])\} (1 + [I]/K_I)}, \\ v &= \frac{k_p E_0}{(1 + K_M/[S]) (1 + [I]/K_I)}. \end{aligned} \quad (IV. 12)$$

Во второй модели (фиг. 27, Б) присутствие ингибитора в активном центре фермента не обязательно исключает образование комплекса с молекулой субстра-

А. Конку

Б. Беско

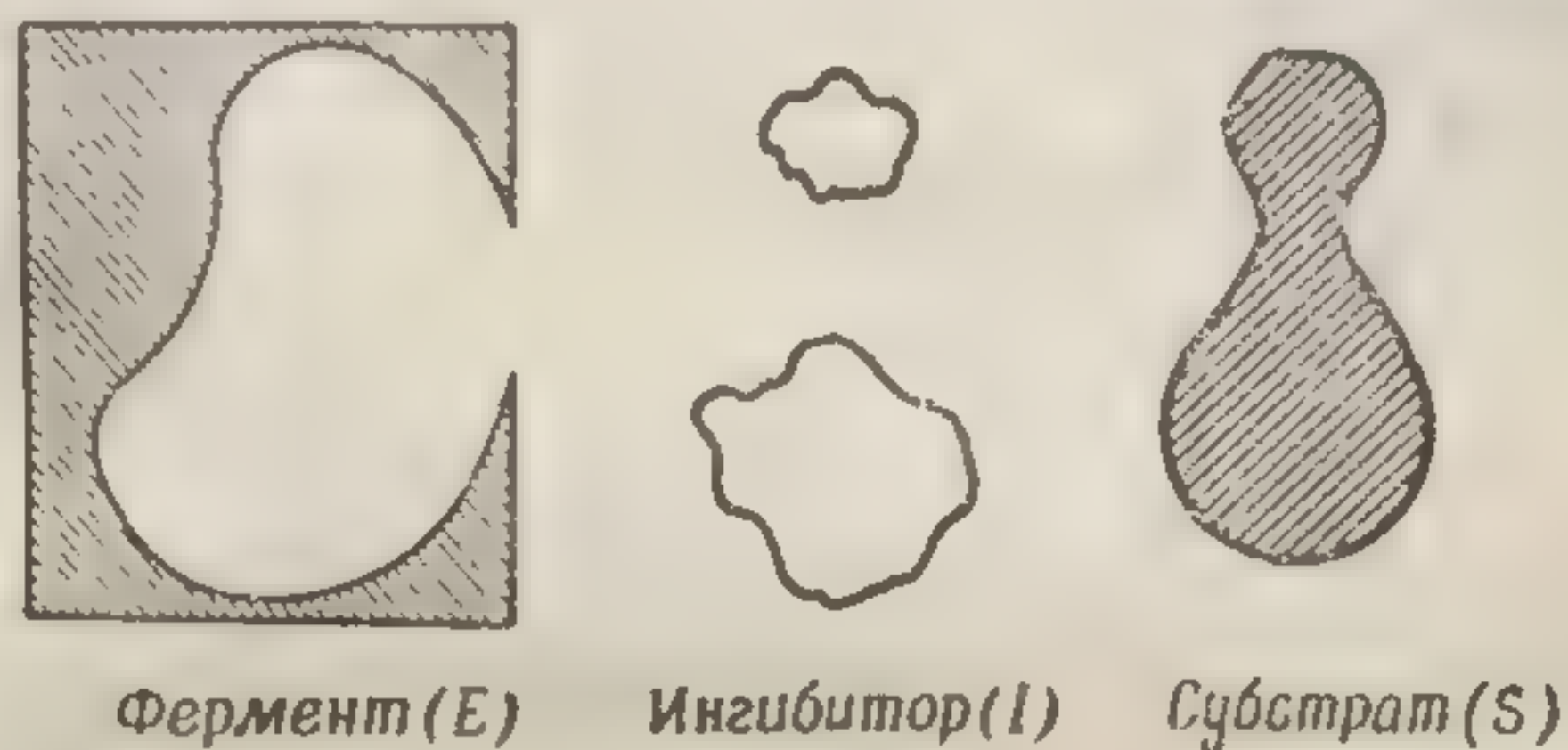
Фер

Фиг. 27. Р

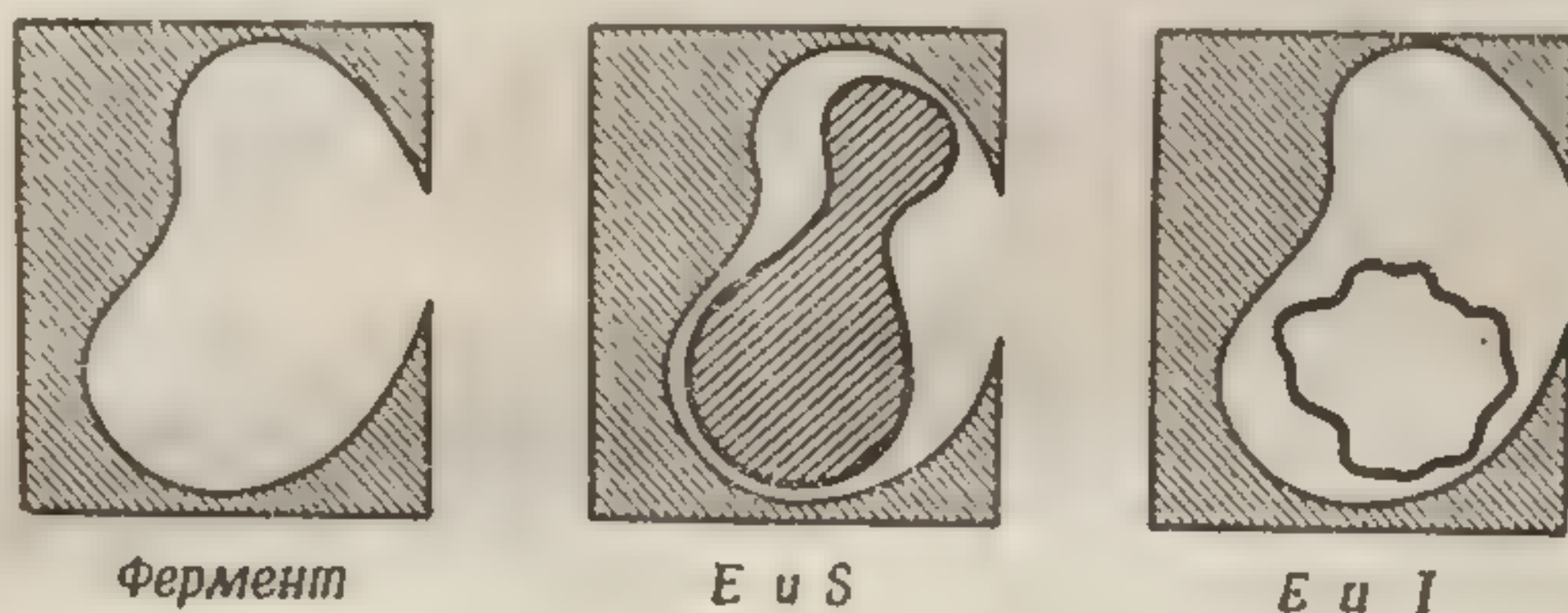
вать, это  
ным инг  
ингибит



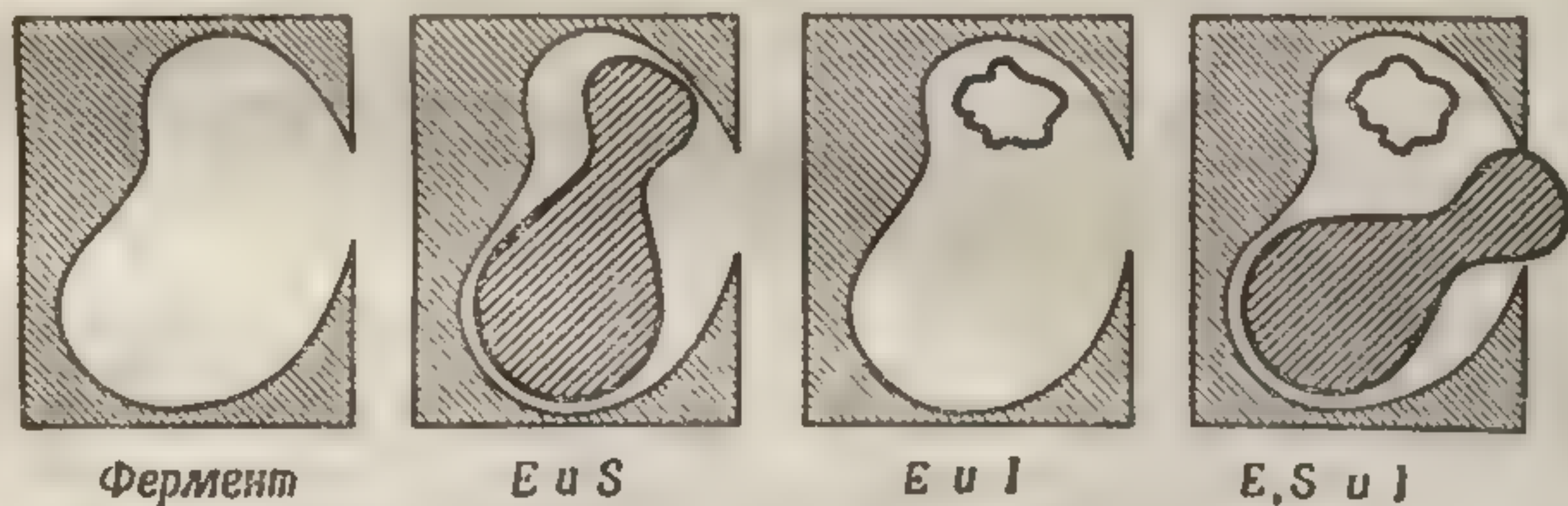
та, однако ингибитор предотвращает химическое каталитическое действие фермента. При условии что комплекс фермент—ингибитор (EI) способен диссоцииро-



А. Конкурентное ингибирование



Б. Бесконкурентное ингибирование

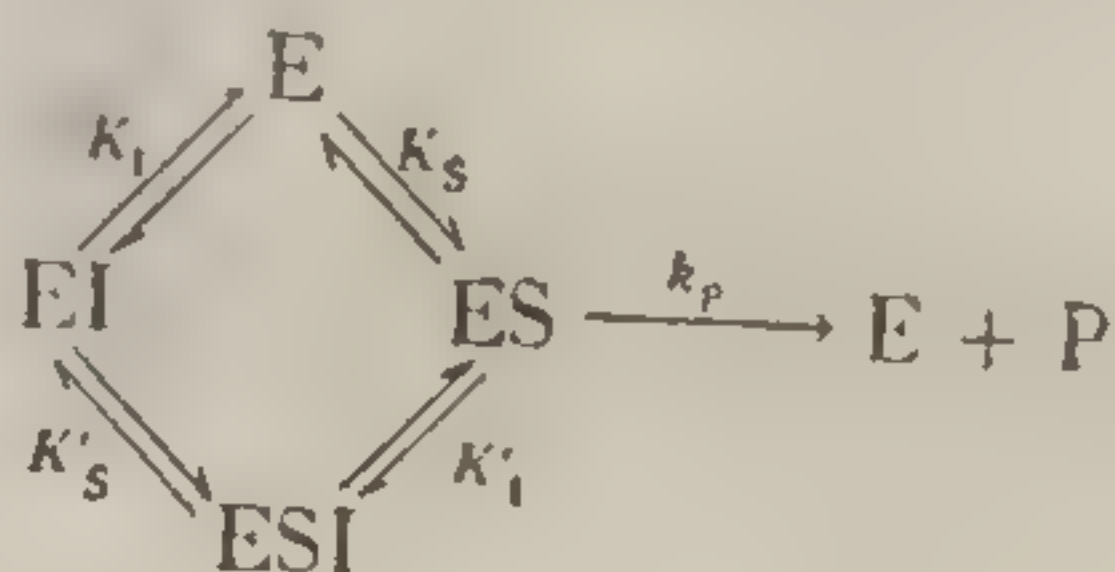


Ф и г. 27. Модели обратимого ингибирования фермент-субстратных реакций.

вать, этот тип ингибирования называется *бесконкурентным ингибированием* (uncompetitive). Особый случай ингибирования этого типа, при котором присутствие ингибитора не влияет на связывание субстрата с активным центром фермента, называется *неконкурентным*



(noncompetitive) ингибированием. При бесконкурентном ингибировании возможны четыре различных состояния ферментного центра — ES, E, EI и ESI. Условия стационарности для этих четырех состояний даются уравнениями (IV. 13)<sup>1</sup>



$$K_i = k_{-1}/k_1$$

$$\begin{aligned}
 \frac{-d[E]}{dt} &= 0 = (k_s[S] + k_1[I])[E] - k_{-s}[ES] - k_{-1}[EI] - k_p[ES], \\
 \frac{-d[ES]}{dt} &= 0 = (k_{-s} + k_p + k'_1[I])[ES] - k_s[S][E] - k'_{-1}[ES], \\
 \frac{-d[EI]}{dt} &= 0 = (k_{-1} + k'_s[S])[EI] - k'_{-s}[ESI] - k_1[E][I], \\
 \frac{-d[ESI]}{dt} &= 0 = (k'_{-1} + k'_{-s})[ESI] - k'_s[S][EI] - k'_1[I][ES].
 \end{aligned}
 \tag{IV. 13}$$

<sup>1</sup> Предлагаемые автором здесь и ниже номенклатура и трактовка типов ингибирования расходятся с общепринятыми (см. М. Диксон и Э. Уэбб, Ферменты, ИЛ, М., 1966). Критерий конкурентного ингибирования [уравнение (IV. 12)] состоит в том, что ингибитор увеличивает значение  $K_M$ , но не влияет на  $V_{\max}$ ; иначе говоря, при достаточно высокой концентрации субстрата  $S$  ингибитор вытесняется из комплекса EI. При неконкурентном (noncompetitive) типе ингибирования [уравнения (IV. 13) — (IV. 15)] ингибитор снижает  $V_{\max}$ . Если при этом величина  $K_M$  не изменяется, то говорят о полностью неконкурентном ингибировании; оно наблюдается в случае образования трудно диссоциирующих, неактивных комплексов типа EI и(или) EIS. При ингибировании смешанного, или частично неконкурентного, типа снижение  $V_{\max}$  сочетается с увеличением  $K_M$ ; это свидетельствует о том, что комплекс EI сохраняет частичную активность, т. е. способен к образованию промежуточного соединения EIS, в котором субстрат подвергается замедленному каталитическому превращению.

В относительно редких случаях степень торможения активности фермента увеличивается с повышением концентрации субстрата. Для этого явления предложен довольно неудачный термин бесконкурентное (uncompetitive) ингибирование. Один из возможных механизмов такого торможения [но не единственный — ср. Dodgson et al., Nature, 177, 432 (1956)] состоит в том, что ингибитор может соединяться только с ES, образуя неактивный или медленно реагирующий комплекс ESI. — Прим. ред.



Для того чтобы вывести уравнение скорости, нужно решить эту систему четырех алгебраических уравнений, выразив результат через измеримые переменные  $[S]$  и  $[I]$ , общую концентрацию фермента  $E_0$  и некоторую комбинацию кинетических констант. Алгебраическое решение можно несколько упростить, используя условие сохранения массы

$$E_0 = [E] + [ES] + [EI] + [ESI], \quad (IV. 14)$$

которое позволяет уменьшить число переменных на единицу. Тем не менее выражение для  $[ES]$  получается чрезвычайно сложным:

$$v = k_p [ES] = \frac{k_p E_0 [S]}{K_M} \left[ 1 + r \frac{k_{-I} k_{-S} k'_I [I]}{k_{-I} k'_{-S} \{k'_I [I] + k_{-S} (1+r)\} + k'_{-I} k_{-S} (1+r) (k'_S [S] + k_{-I})} \right] \\ = \frac{1}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_I} + \frac{[S][I]}{K_M K'_I} \left[ 1 + r \frac{k'_{-S} \{ (k_{-I} - k'_{-I}) k_{-S} (1+r) + k_{-I} k'_{-I} (1 + [I] K'_I) \}}{k_{-I} k'_{-S} \{k'_I [I] + k_{-S} (1+r)\} + k'_{-I} k_{-S} (1+r) \{k'_S [S] + k_{-I}\}} \right]} \quad (IV. 15)$$

где  $r = k_p/k_{-S}$  и  $K_M = (k_{-S} + k_p)/k_S$ .

Это уравнение в том виде, в каком оно здесь приведено, не может быть практически использовано для количественных расчетов. Оно служит лишь иллюстрацией того, как быстро увеличение сложности формальной кинетической модели приводит к алгебраическим выражениям, чрезмерно громоздким для того, чтобы ими можно было воспользоваться на практике. Кроме того, оно показывает, что  $v^{-1}$  не обязательно должно зависеть линейно от  $[S]^{-1}$  или  $[I]$ . Тщательное рассмотрение уравнения (IV. 15) и приведенного ниже уравнения (IV. 16) показывает, что  $[ES]$  не может возрасти быстрее, чем  $[S]$ , и не может уменьшаться медленнее, чем увеличивается  $[I]$ . Однако существуют системы фермент—субстрат—ингибитор (или активатор), в которых это правило нарушается. К ним относятся многие ферменты, играющие важную роль в регуляции метаболических процессов. В этих случаях формальная



модель катализа должна отличаться от моделей, описываемых уравнениями (IV.12) и (IV.13). В одном из следующих разделов мы детально рассмотрим примеры систем фермент—субстрат—модификатор, в которых наблюдаемая зависимость скорости реакции от концентрации имеет такой аномальный характер. Однако эта аномалия лишь кажущаяся; она возникает вследствие того, что во всех до сих пор выводившихся кинетических уравнениях молчаливо предполагалось, что активные центры ферментов ведут себя независимо друг от друга. Это допущение правомерно, если мы имеем по одному центру на молекулу фермента. Когда же в молекуле фермента имеется больше одного центра, присутствие в одном центре связанной молекулы субстрата или модификатора может изменить способность к связыванию или каталитическую активность другого центра в той же молекуле. Такие многоцентровые ферменты, у которых наблюдаются «кооперативные» взаимодействия центров, были названы аллостерическими ферментами. Вернемся к обсуждению неаллостерических систем и введем два допущения, позволяющих сильно упростить уравнение (IV.15), определяющее скорость реакции:

1) В условиях, когда присутствие связанного ингибитора не сказывается на способностях активного центра фермента связывать субстрат и наоборот ( $K_S = K'_S$ ,  $K_I = K'_I$ ), т. е. в условиях неконкурентного торможения, резонно принять, что  $k_S = k'_S$ ,  $k_{-I} = k'_{-I}$  и т. д. В этом случае уравнение (IV.15) принимает вид

$$v = k_P [ES] = \frac{\frac{k_P E_0 [S]}{K_M} \left[ 1 + r \frac{k_I [I]}{k_I [I] + (k_S [S] + k_{-S} + k_{-I}) (1+r)} \right]}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_I} + \frac{[S][I]}{K_M K'_I} \left[ 1 + r \frac{k_{-I} + k_I [I]}{k_I [I] + (k_S [S] + k_{-S} + k_{-I}) (1+r)} \right]}. \quad (IV.16)$$

Можно видеть, что и при этом допущении выражение для  $[ES]$  остается все еще весьма громоздким.

2) В условиях, когда константа скорости распада  $ES$  до продуктов ( $k_P$ ) мала по сравнению со скоростями превращения  $ES$  в  $E$  и  $ESI$ , т. е. в условиях квазирав-



новесия ( $r \approx 0$ ), концентрации всех форм фермента определяются их равновесными константами диссоциации, и выражение для скорости реакции сильно упрощается, принимая вид

$$v = \frac{k_p E_0}{1 + \frac{K_s}{[S]} \left( 1 + \frac{[I]}{K_1} \right) + \frac{[I]}{K'_1}} \quad (\text{IV. 17})$$

Если ингибирование неконкурентно по отношению к субстрату ( $K_1 = K'_1$ ), то уравнение (IV. 17) приводится к выражению для скорости реакции, обычно называемому *уравнением скорости реакции в случае неконкурентного ингибирования*:

$$v = \frac{k_p E_0}{\left( 1 + \frac{K_s}{[S]} \right) \left( 1 + \frac{[I]}{K_1} \right)} \quad (\text{IV. 18})$$

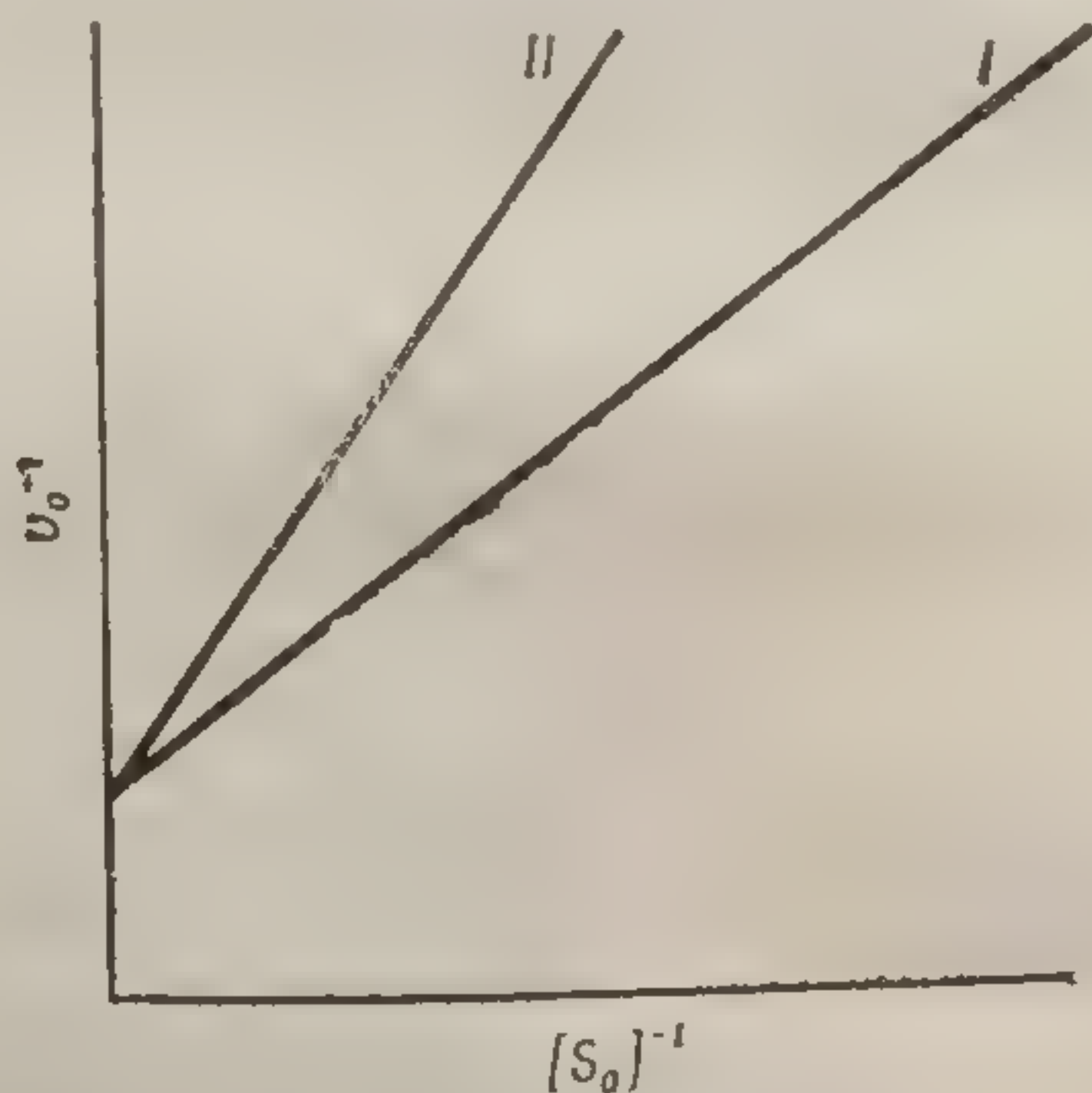
Следует отметить, что в уравнениях (IV. 17) и (IV. 18) молчаливо предполагается, что все промежуточные продукты находятся в равновесии. Следовательно, оно справедливо только при условиях, принятых при выводе уравнения (IV. 6) ( $K_s = K_m$ ).

В присутствии неконкурентного ингибитора вопрос о том, находятся ли промежуточные комплексы (ES, ESI) в равновесных или в стационарных концентрациях, можно решить, исследуя детально зависимость скорости реакции от концентраций субстрата и неконкурентного ингибитора. Следует отметить, что форма зависимости  $v$  от  $[I]$  в значительной степени определяется величиной  $r$ .

Можно ожидать, что молекулы, «похожие» на молекулы субстрата, но отличающиеся от субстрата отсутствием реакционноспособного центра, будут проявлять свойства конкурентных ингибиторов фермента. Если реакция практически необратима, то ее продукт нередко обладает такими свойствами. Действительно, в системах, для которых справедлива модель Михаэлиса—Ментен, ингибирование продуктом обычно может быть описано уравнением (IV. 12). Часто одна какая-нибудь деталь структуры молекулы субстрата играет главную



роль в его связывании активным центром фермента. В таких случаях молекулы, обладающие этой единственной структурной особенностью, могут функционировать в качестве эффективных конкурентных ингибиторов. Например, фиг. 28 показывает, что соединение с ароматическим кольцом, у которого отсутствуют все остальные признаки субстрата, конкурентно ингибирует

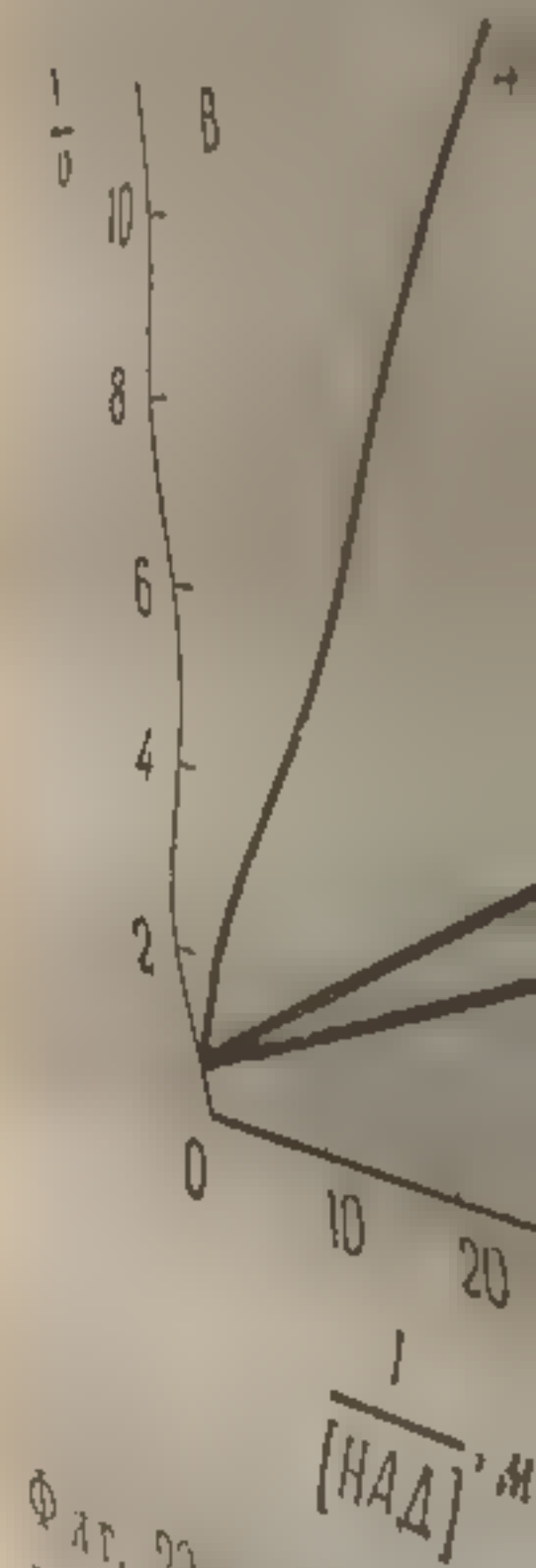


Фиг. 28. Обратимое конкурентное ингибирование гидролиза ацетил-L-триптофанамида, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином.

I — гидролиз в отсутствие индола, II — в присутствии  $10^{-3}$  М индола.

реакцию фермента с субстратом. На фиг. 29 показано конкурентное ингибирование реакций глицеральдегидфосфатдегидрогеназы.

Малая молекула, способная обратимо блокировать каталитический участок внутри активного центра фермента, но, несмотря на это, позволяющая молекуле субстрата проникнуть в ферментный центр, будет действовать в качестве «бесконкурентного» ингибитора. Несконкурентное ингибирование может наблюдаться в тех случаях, когда энергия связывания субстрата с ферментом определяется главным образом взаимодействием каталитически не активных боковых цепей аминокислот фермента с нереакционноспособным скелетом молекулы субстрата, а ингибитор представляет собой очень малую молекулу, в которой этот скелет отсутствует.



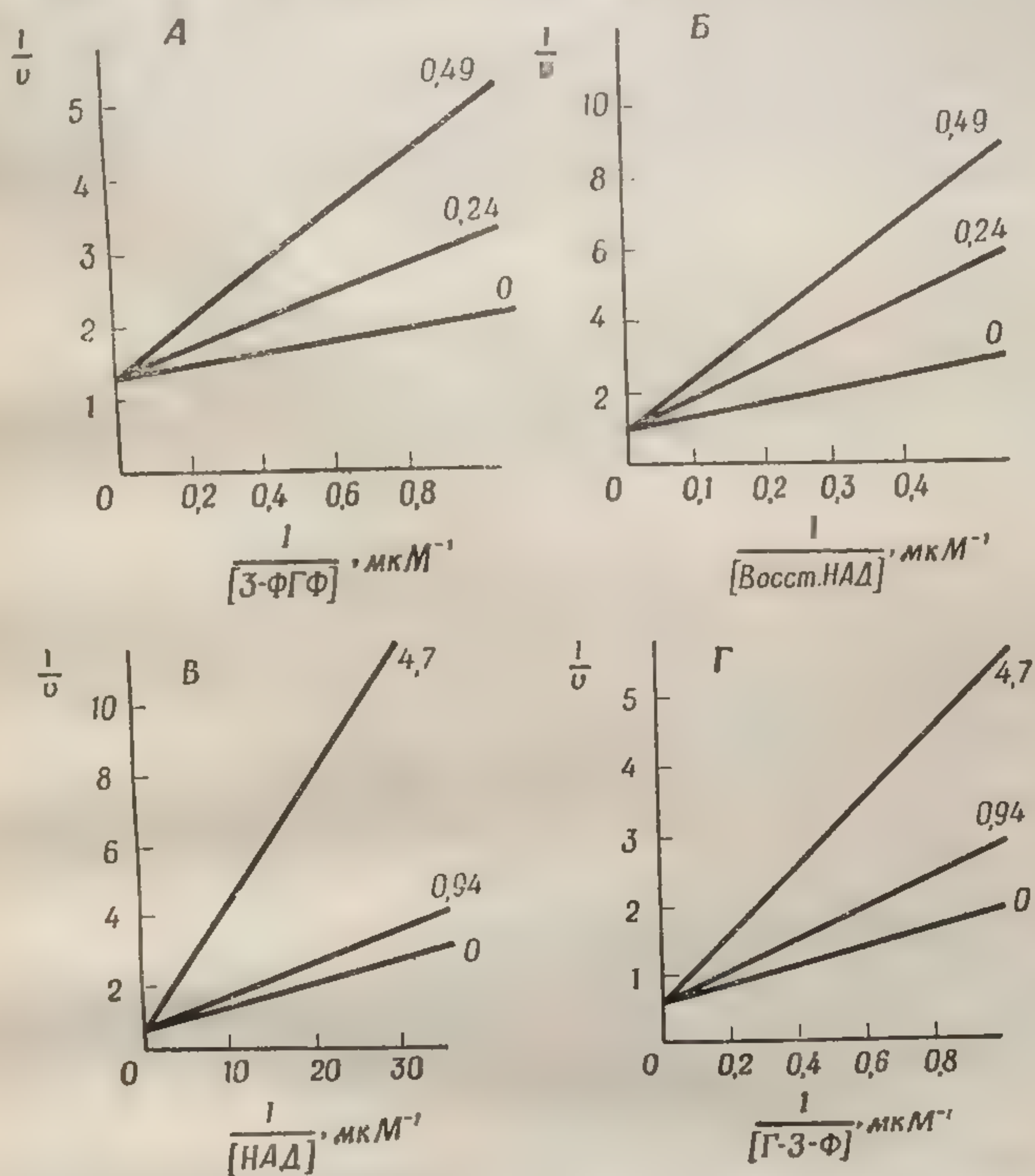
Фиг. 29. Конкурентное ингибирование глицеральдегидфосфатдегидрогеназы.

А и Б. Ингибирование глицеральдегидфосфатдегидрогеназы 3-фосфатом индола. На графике (фиг. 29) показаны зависимости  $v_0^{-1}$  от  $[S_0]^{-1}$  для различных концентраций индола. Видно, что ингибитор действует конкурентно, так как все прямые пересекаются в одной точке на оси абсцисс.

Ферментов, являющихся катализаторами в молекулах, содержащих ароматическое кольцо, ингибиторы, обладающие этой особенностью, могут функционировать в качестве эффективных конкурентных ингибиторов.



Очень маленькой частицей, обратимо взаимодействующей подобным образом с активными центрами многих



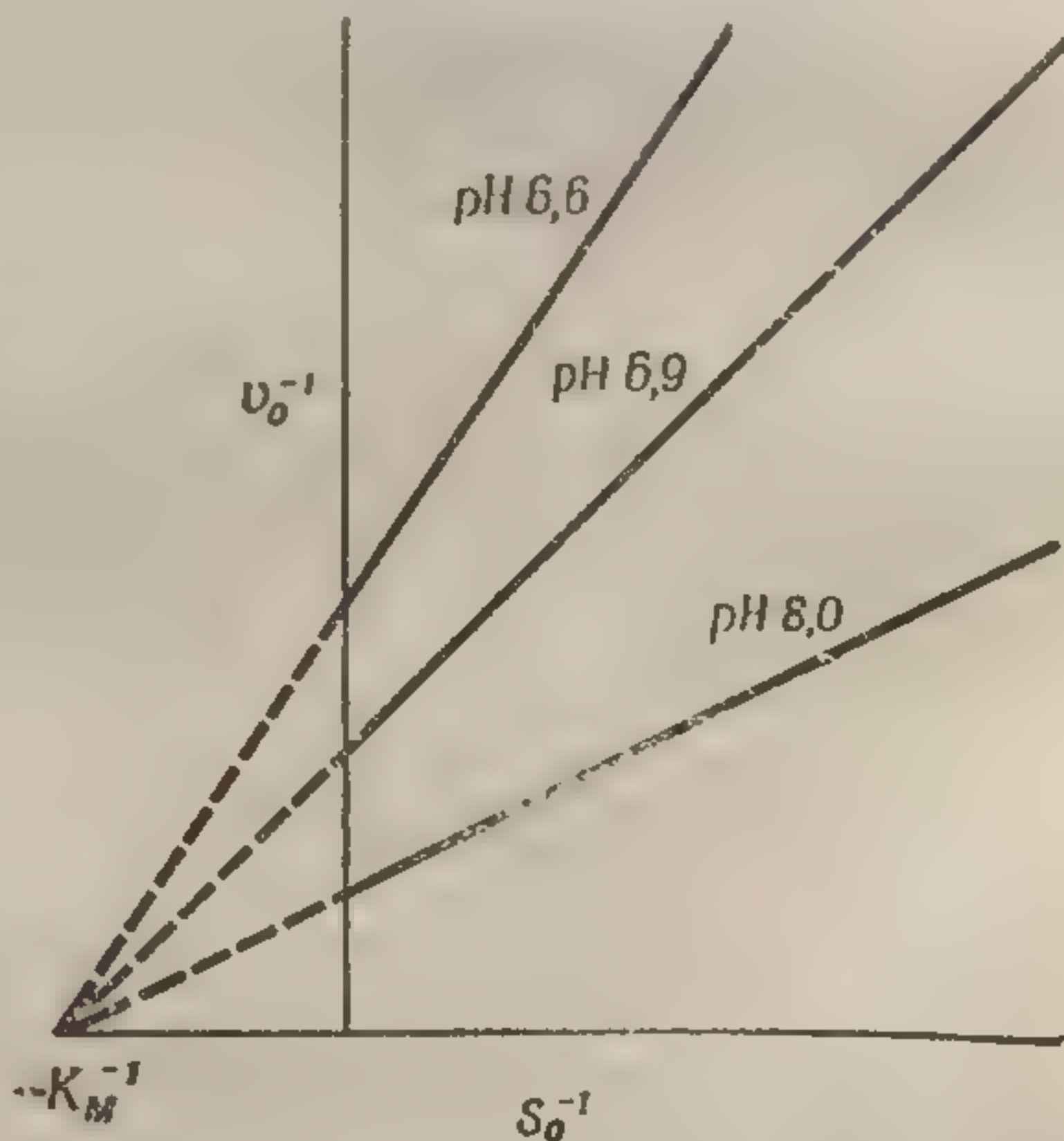
Фиг. 29. Конкурентное ингибирование реакций, катализируемых глицеральдегидфосфатдеhydroгеназой (C. S. Furfine and S. F. Velick, J. Biol. Chem., 240, 844, 1965).

А и Б. Ингибирование глицеральдегид-3-фосфатом (Г-3-Ф), конкурентное по отношению к 3-фосфоглицероилфосфату (3-ФГФ) и к восстановленному НАД соответственно (рН 7,4, 26°). Цифры на прямых означают концентрации Г-3-Ф в микромолях. В и Г. Ингибирование восстановленным НАД, конкурентное по отношению к НАД и к Г-3-Ф, в тех же условиях. Цифры на прямых означают концентрации восстановленного НАД в микромолях. (См. также стр. 121—124.)

ферментов, является протон. Каталитическое действие большинства ферментов связано, по-видимому, с присутствием в молекуле фермента слабого основания и



(или) сопряженной слабой кислоты. Ассоциация иона водорода с таким слабым основанием и(или) диссоциация сопряженной кислоты приводят к потере каталитической активности. Благодаря своему малому объему этот протон может не нарушить способности фермента связывать субстрат. Неконкурентное торможение ионом водорода представлено на фиг. 30.

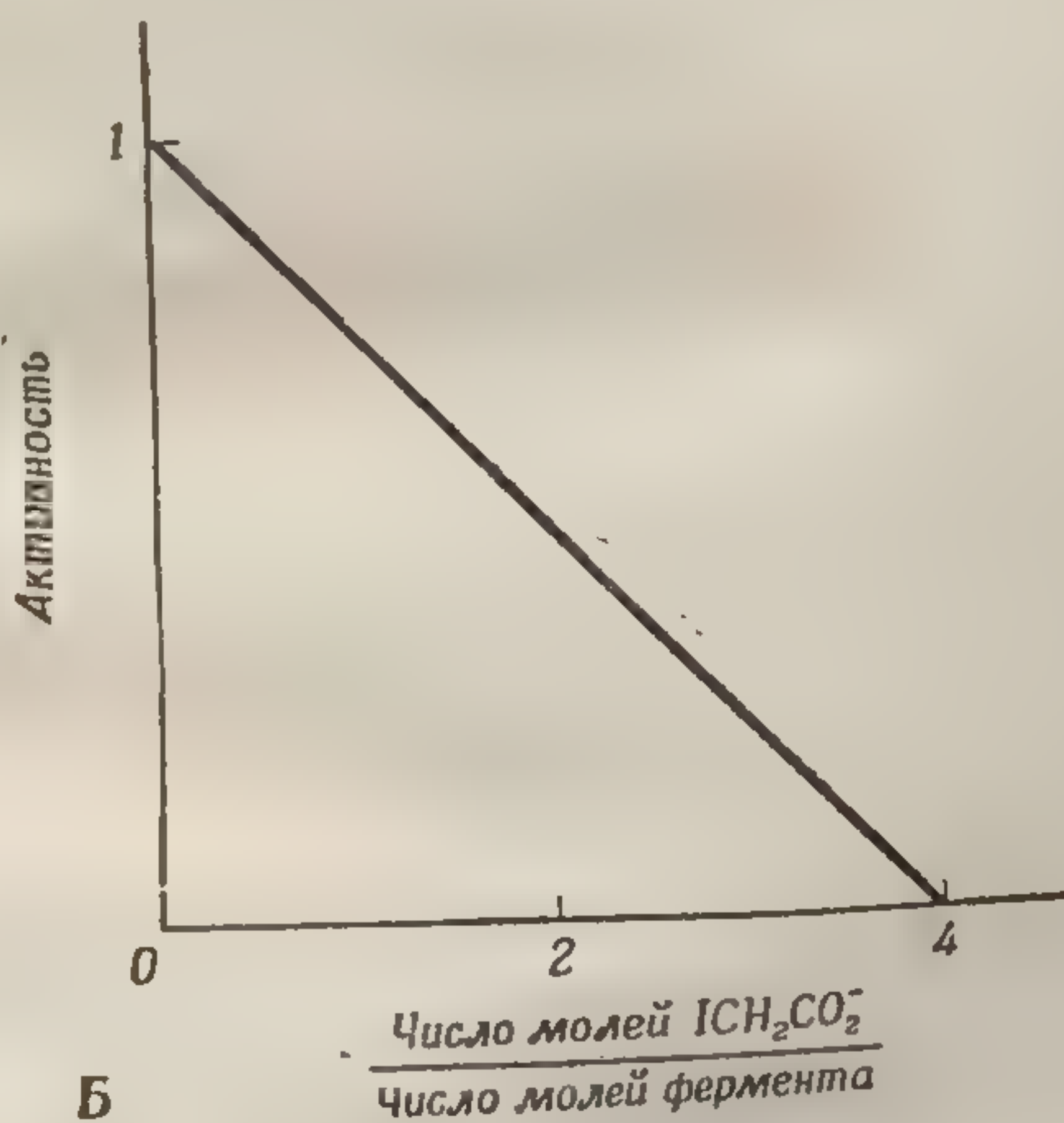
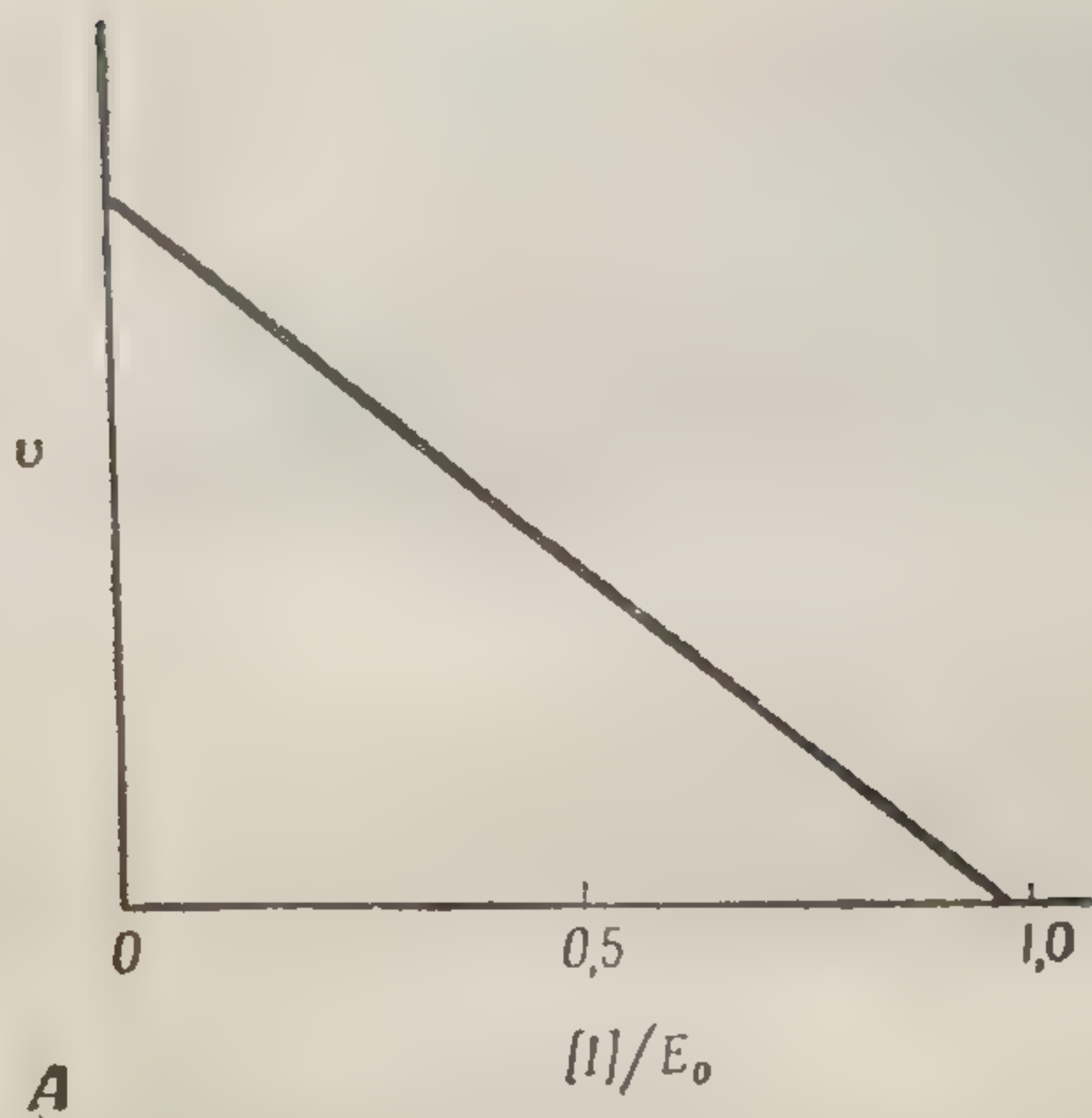


Фиг. 30. Неконкурентное ингибирование ионом водорода гидролиза ацетил-L-триптофанамида.

Обратите внимание, что в отличие от случая, приведенного на фиг. 29, прямые пересекают ось  $v_0^{-1}$  в разных точках. О неконкурентном типе ингибирования [уравнение (IV.18)] свидетельствует их пересечение в одной точке (воображаемой), лежащей на оси  $S_0^{-1}$ .

*Необратимое ингибирование* происходит в тех случаях, когда воздействие на фермент стехиометрических количеств ингибитора приводит к инактивации фермента (фиг. 31). Необратимое ингибирование следует отличать от процессов, при которых имеет место разрушение активного центра вследствие денатурации (нарушения специфической конформации полипептида) или же химической деградации фермента. Необратимый ингибитор взаимодействует с каталитической группой фермента, тем самым разрушая ее. Он может иметь структурное сходство с субстратом, но может и не иметь





Фиг. 31.

А. Ингибирование гидролиза ацетил-L-триптофанамида с помощью необратимого ингибитора — диизопропилфторфосфата. Реакция ингибитора с ферментом ( $\alpha$ -химотрипсин) протекает стехиометрически. Б. Ингибирование глицеральдегид-фосфатдегидрогеназы иодацетатом.

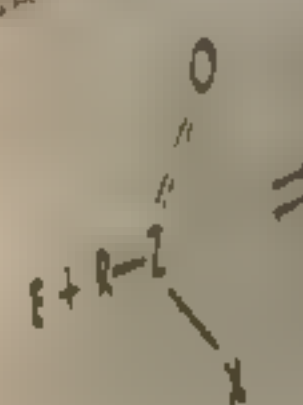


его. Необратимыми ингибиторами являются, в частности, ионы тяжелых металлов вследствие их способности образовывать прочные комплексы с основаниями или *нуклеофилами* (функциональными группами, которые служат хорошими донорами свободной пары электронов). Например, соединения ртути ( $\text{Hg}^{2+}$ ) образуют очень прочные комплексы с сульфгидрильными группами и потому необратимо ингибируют многие ферменты, в которых сульфгидрильные группы важны для катализа.

Если в ходе каталитической реакции фермента с субстратом происходит образование *метастабильного ковалентного* промежуточного соединения фермента с субстратом, то другие молекулы, способные к образованию аналогичных *ковалентных*, но стабильных соединений с ферментом, будут действовать как необратимые ингибиторы. Подобные стабильные соединения образуются некоторыми органическими производными фосфорной кислоты, известными под групповым названием *нервные газы*. Все ферменты, ингибируемые этими ядами, содержат каталитически активную гидроксильную группу серина; образующиеся соединения фермент — ингибитор представляют собой стабильные сложные эфиры фосфорной кислоты и серина. Ингибирование соединениями этого рода иллюстрирует фиг. 31, А.

#### 4. ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Хотя модель Михаэлиса—Ментен может формально описать значительную долю наблюдаемых зависимостей скорости реакции от концентрации субстрата, при анализе скоростей ферментативных реакций в соответствии с этой моделью неизбежно остаются в стороне некоторые наиболее интересные молекулярные детали механизма катализа. В конечном счете нас больше всего интересует механизм, по которому происходит превращение  $\text{ES} \rightarrow \text{E} + \text{P}$ . Для того чтобы глубже проникнуть в этот механизм, требуется более детальный химический анализ системы. В последние годы для многих фермент-субстратных систем было показано, что



В случае пр  
подобного  
следующего

Придержи  
получаем

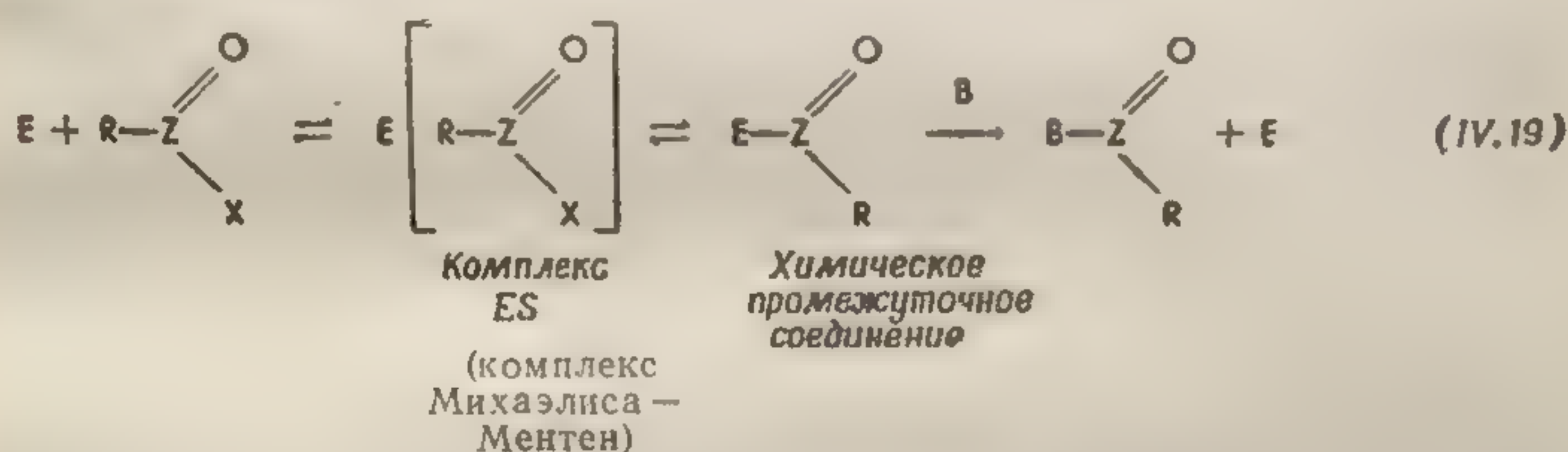
$$v = k_2 [\text{ES}]$$

Это уравн

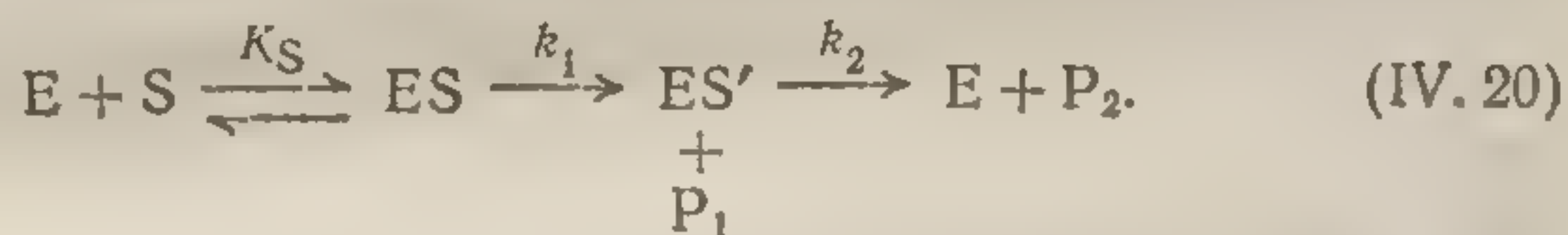
где



превращение  $ES \rightarrow P$  протекает с образованием ряда промежуточных продуктов. Их существование выражается наличием дискретных минимумов на энергетической кривой, изображенной на фиг. 32. В небольшом числе случаев такие промежуточные продукты действительно были «уловлены» и идентифицированы, как, например, при некоторых ферментативных реакциях переноса ацильных и фосфорильных остатков:



В случае практически необратимой реакции кинетику подобного процесса можно формально описать моделью следующего типа:



Придерживаясь гипотезы о стационарном состоянии, получаем следующее уравнение скорости реакции:

$$v = k_2 [ES'] = \frac{k_1 E_0}{1 + \frac{K_S}{[S]} + \frac{k_1}{k_2 [S]} + \frac{k_1}{k_2}} = \frac{\frac{k_1 k_2 E_0}{k_1 + k_2}}{1 + \frac{k_2}{k_1 + k_2} \frac{K_S}{[S]} + \frac{k_1}{k_2 [S]}}. \quad (IV.21)$$

Это уравнение может быть переписано в виде

$$v = \frac{k_0 E_0}{1 + K'/[S]},$$

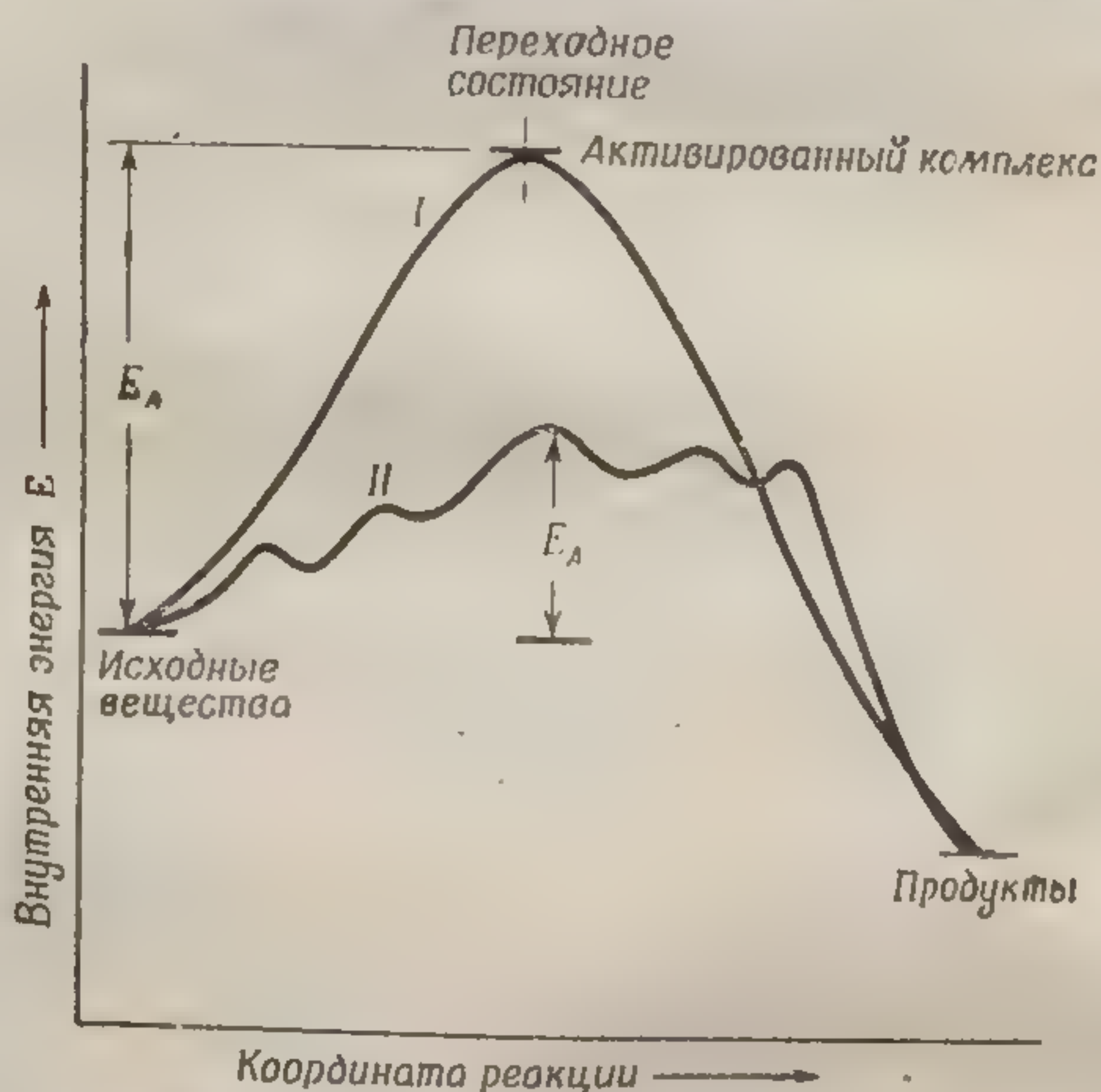
где

$$k_0 = \frac{k_1 k_2}{k_1 + k_2},$$

$$K' = \frac{k_2 K_S}{k_2 + k_1} + \frac{k_1}{k_2}.$$



Полученное уравнение по форме идентично уравнению (IV. 5), и, следовательно, система, в которой реакция идет по этому, на вид более сложному пути, все же описывается моделью Михаэлиса—Ментен. Однако смысл константы  $K'$  в этом случае может фундаментально отличаться от смысла, обычно вкладываемого



Фиг. 32. Кривые, иллюстрирующие изменения внутренней энергии в процессе реакций, протекающих в одну стадию (I) и через несколько метастабильных промежуточных соединений (II).

в величину  $K_M$ , так как  $K'$  может зависеть от относительных значений двух кинетических констант  $k_1$  и  $k_2$ . Если  $k_1$  — величина того же порядка или больше, чем  $k_2$ , то  $K'$  будет зависеть от отношения двух кинетических констант скоростей необратимых реакций, и, следовательно, интерпретация константы  $K'$ , исходя из специфических сил комплементарного связывания субстрата и фермента, становится неприложимой. По мере возрастания  $k_1$  по сравнению с  $k_2$  отношение  $[ES]/[ES']$  уменьшается. Таким образом, константа  $K'$  служит мерой количества «связанного» субстрата безотносительно к природе связывания, т. е. она имеет один и тот же



смысл как для комплементарного фермент-субстратного комплекса, где субстрат связан «физически», так и для такого соединения фермента с субстратом, в котором они связаны ковалентными связями.

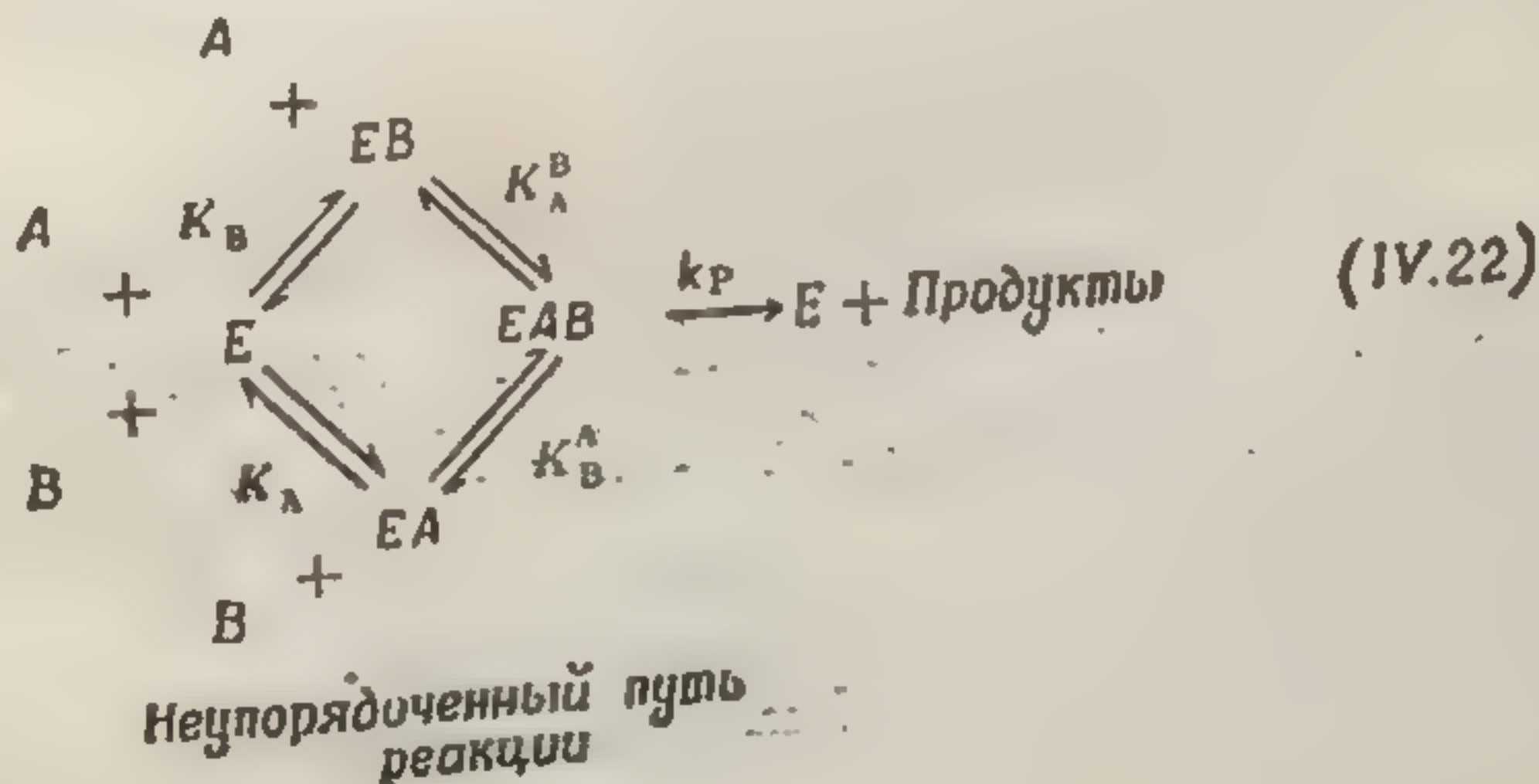
При сравнении серии гомологичных субстратов и соответствующей серии гомологичных конкурентных ингибиторов (например, субстратов и продуктов необратимой реакции) построение графика относительных значений  $K'$  для субстратов как функции  $K_I$  для ингибирующих продуктов позволяет судить о ходе образования фермент-субстратных соединений в процессе реакции субстрата с ферментом.

## 5. РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ НЕСКОЛЬКИХ СУБСТРАТОВ

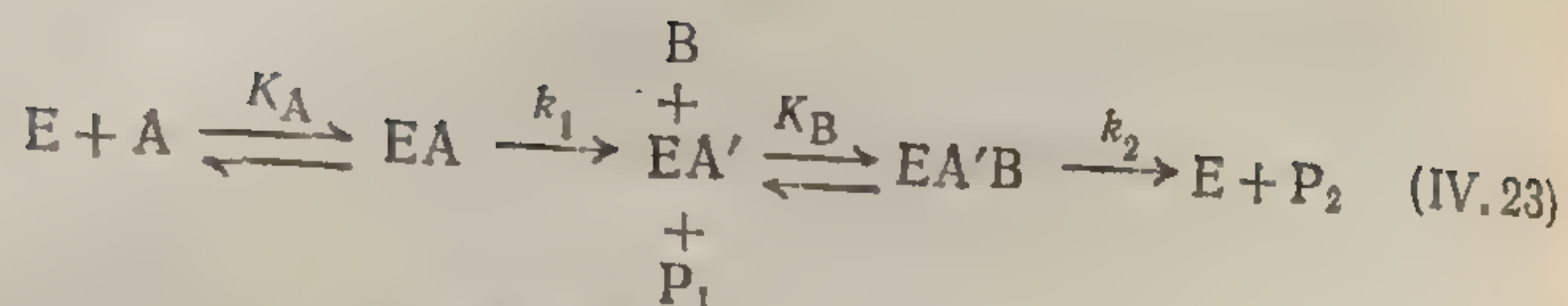
В предыдущем разделе было показано, что две различные модели пути реакции нельзя отличить друг от друга математически с помощью методов стационарной кинетики. О деталях механизма, не находящих отражения в модели Михаэлиса—Ментен, можно было судить только на основании интуитивных химических соображений или химического анализа. Когда катализируемая ферментом реакция протекает с участием двух или более субстратов, концентрации которых можно варьировать независимо, из кинетического эксперимента можно получить более детальные сведения о механизме реакции. Рассмотрим реакцию



При необратимом превращении следует различать два типа возможных последовательностей реакций:







Упорядоченный путь реакции

В первом случае либо реагент А, либо реагент В могут свободно ассоциировать или диссоциировать с ферментом, прежде чем произойдет реакция с участием тройного комплекса (ЕАВ). Во втором случае (он аналогичен образованию дискретных химических промежуточных продуктов в рассмотренных выше одностратных реакциях) путь реакции *упорядочен*. Образование продуктов протекает через стадию предварительного образования фермент-субстратного соединения с одним из реагентов. Уравнения скорости реакции для этих двух моделей совершенно различны. Для упрощения математических операций примем, что диссоциация всех фермент-субстратных комплексов происходит быстро по сравнению со всеми необратимыми химическими реакциями. При данной концентрации реагентов и фермента концентрации всех фермент-субстратных комплексов (но не фермент-субстратных соединений) будут определяться равновесными константами диссоциации. В этом случае уравнения скорости реакции для описываемых двух моделей имеют следующий вид:

Неупорядоченный путь реакции — модель (IV.22)

$$v = \frac{k_p E_0}{1 + \frac{K_A^B}{[A]} + \frac{K_B^A}{[B]} + \frac{K_B K_A^B}{[A][B]}}; \quad (K_A K_B^A = K_B K_A^B). \quad (IV.24)$$

Если связывание реагентов А и В происходит совершенно независимо ( $K_A^B = K_A$ ,  $K_B^A = K_B$ ), то

$$v = \frac{k_p E_0}{\left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right) \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)}.$$

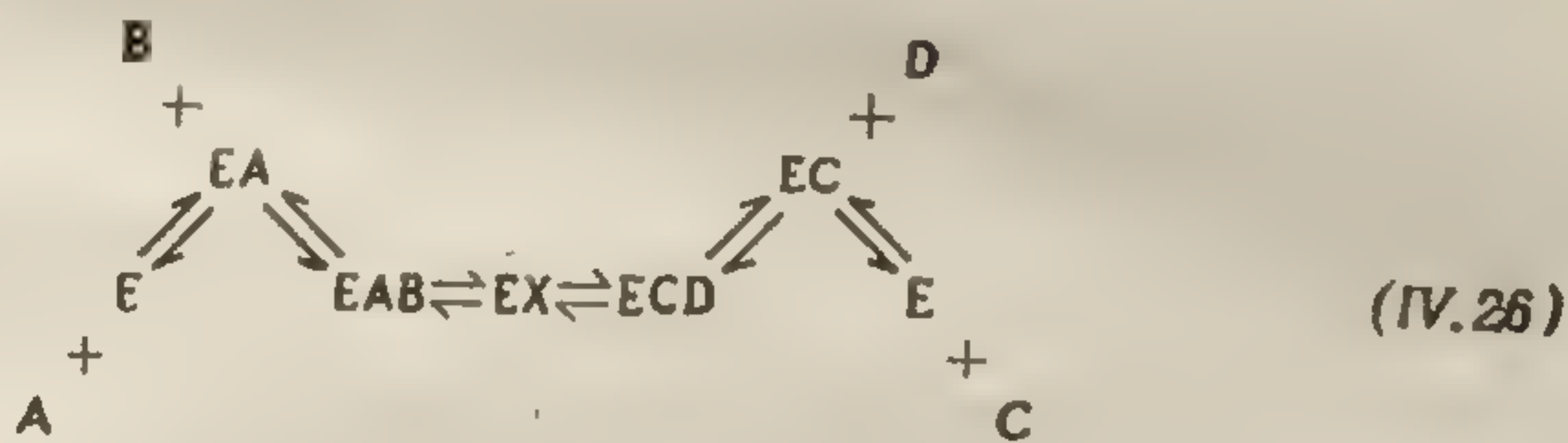


Упорядоченный путь реакции — модель (IV.23)

$$v = \frac{k_2 E_0}{\left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right) + \frac{k_2}{k_1} \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right)}. \quad (\text{IV.25})$$

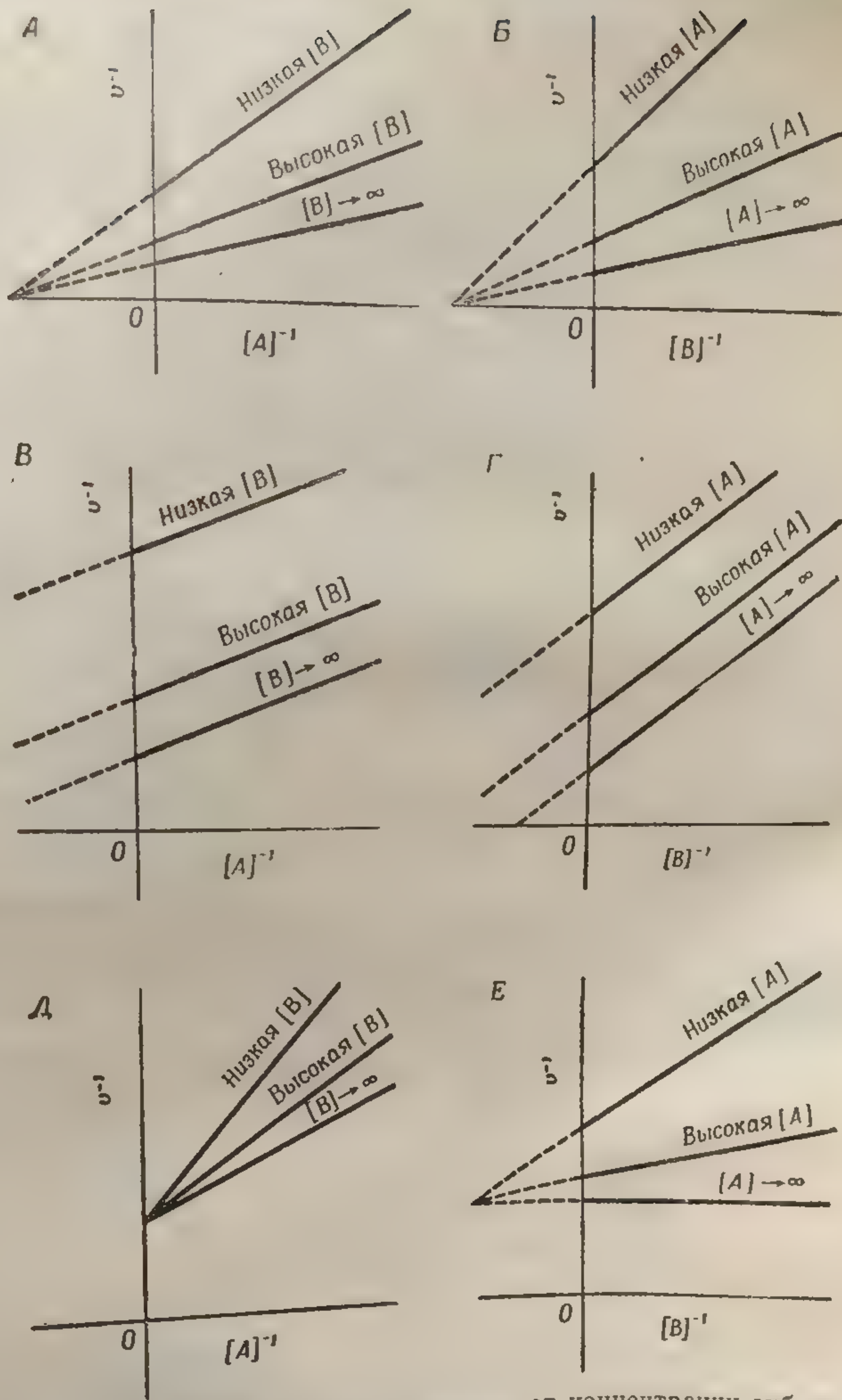
Если фермент имеет измеримое сродство к обоим реагентам, то можно получить «эффект насыщения», т. е. скорость реакции можно определять в условиях, когда фермент насыщен одним из двух реагентов. Комбинируя информацию, полученную в таких экспериментах, с изучением поведения константы  $K'$  для одного из реагентов при разных концентрациях другого, легко различить промежуточные соединения, через которые протекает реакция, при условии, что фермент-субстратные соединения достигают концентраций, сравнимых с концентрациями фермент-субстратных комплексов или более высоких. Ожидаемые для каждой модели [уравнения (IV.22) и (IV.23)] результаты схематически изображены на фиг. 33.

Упорядоченный путь реакции, обсуждавшийся выше [уравнение (IV.23)], был приведен только в качестве иллюстрации. Возможны и другие упорядоченные последовательности реакций, протекающие с образованием промежуточных продуктов; например, возможно, что определенное значение имеет путь реакции (IV.26)



В этом случае фермент-субстратное промежуточное соединение образуется из тройного комплекса (EAB). Подобный путь реакции наблюдается в катализируемых ферментами реакциях с участием пиридоксальфосфата и второго субстрата. Субстраты типа пиридоксальфосфата, которые участвуют во многих различных ферментативных реакциях (катализируемых примерно таким





Ф и г. 33. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата для двусубстратных реакций.

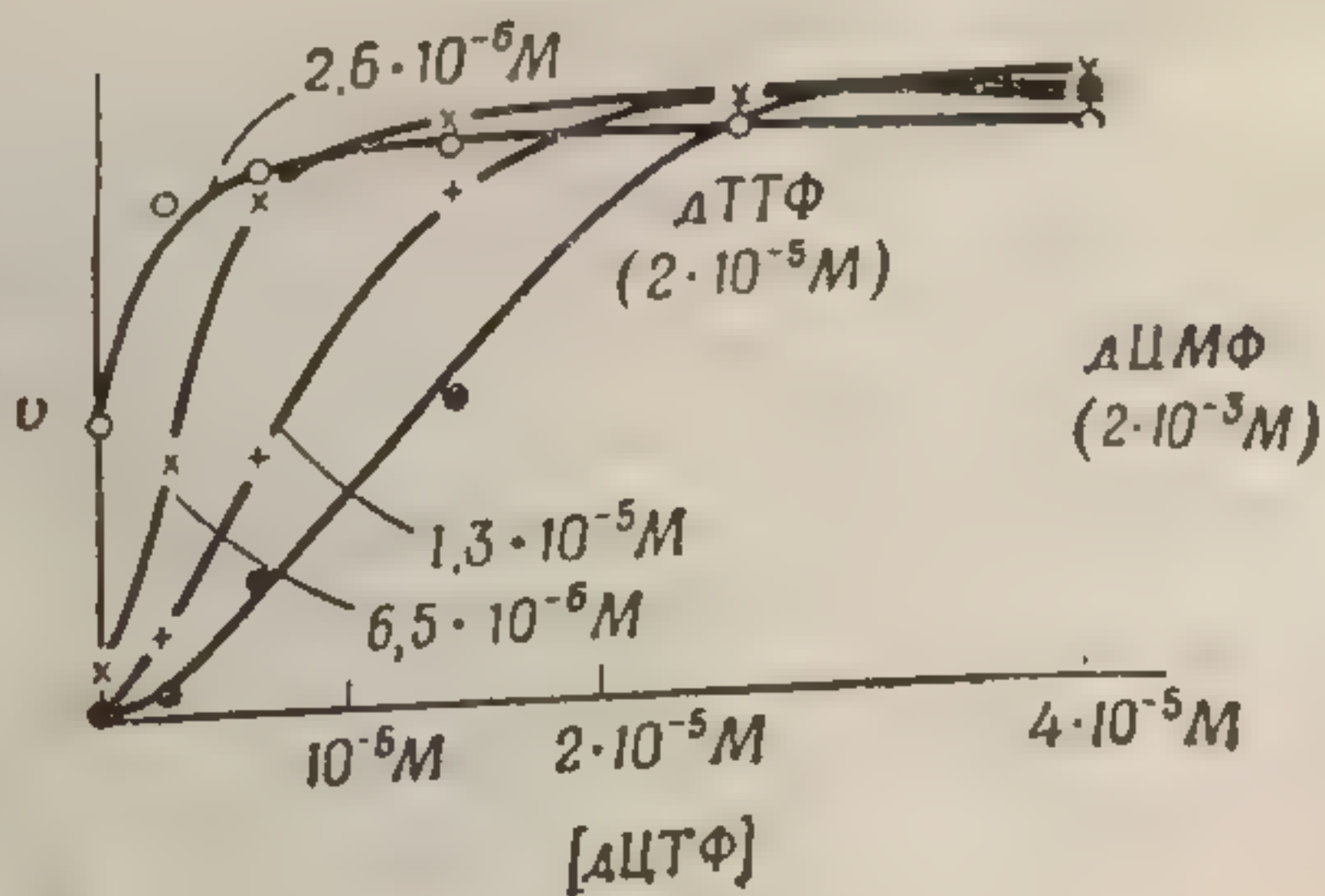
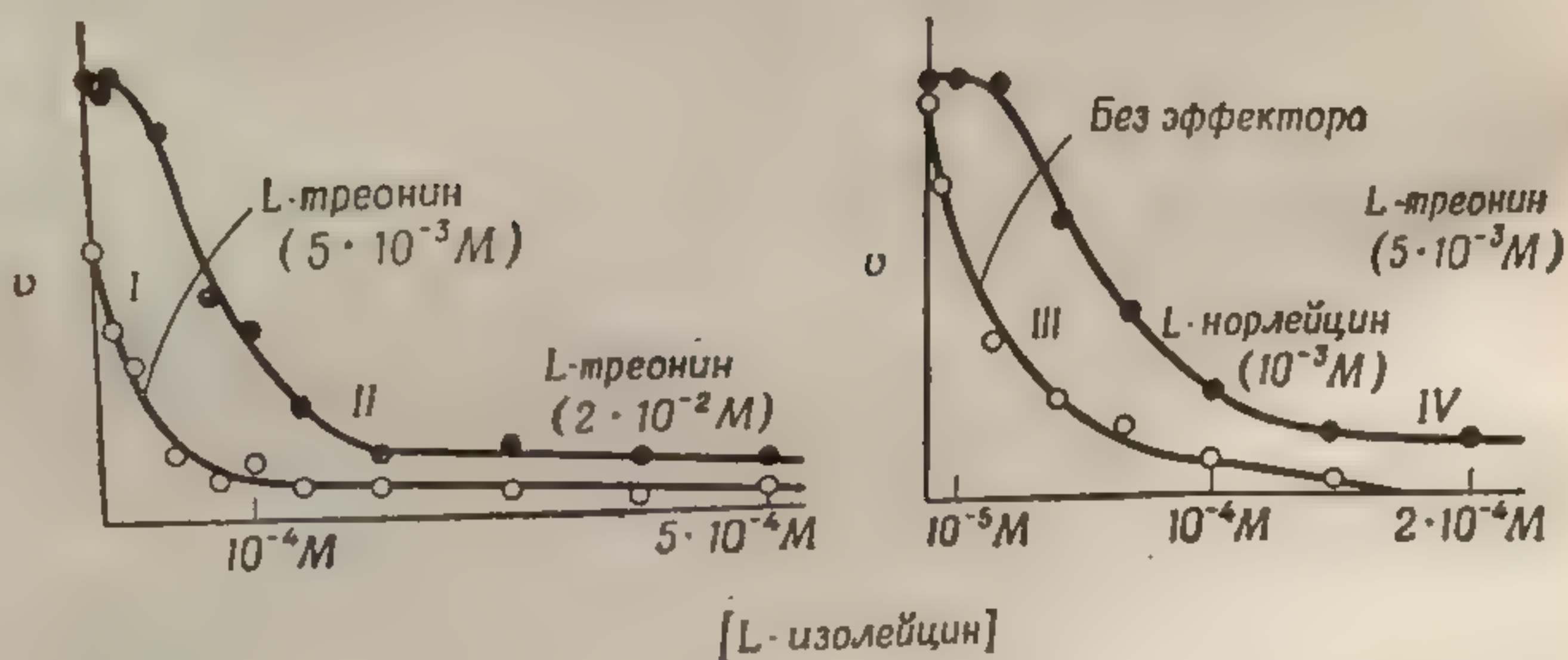
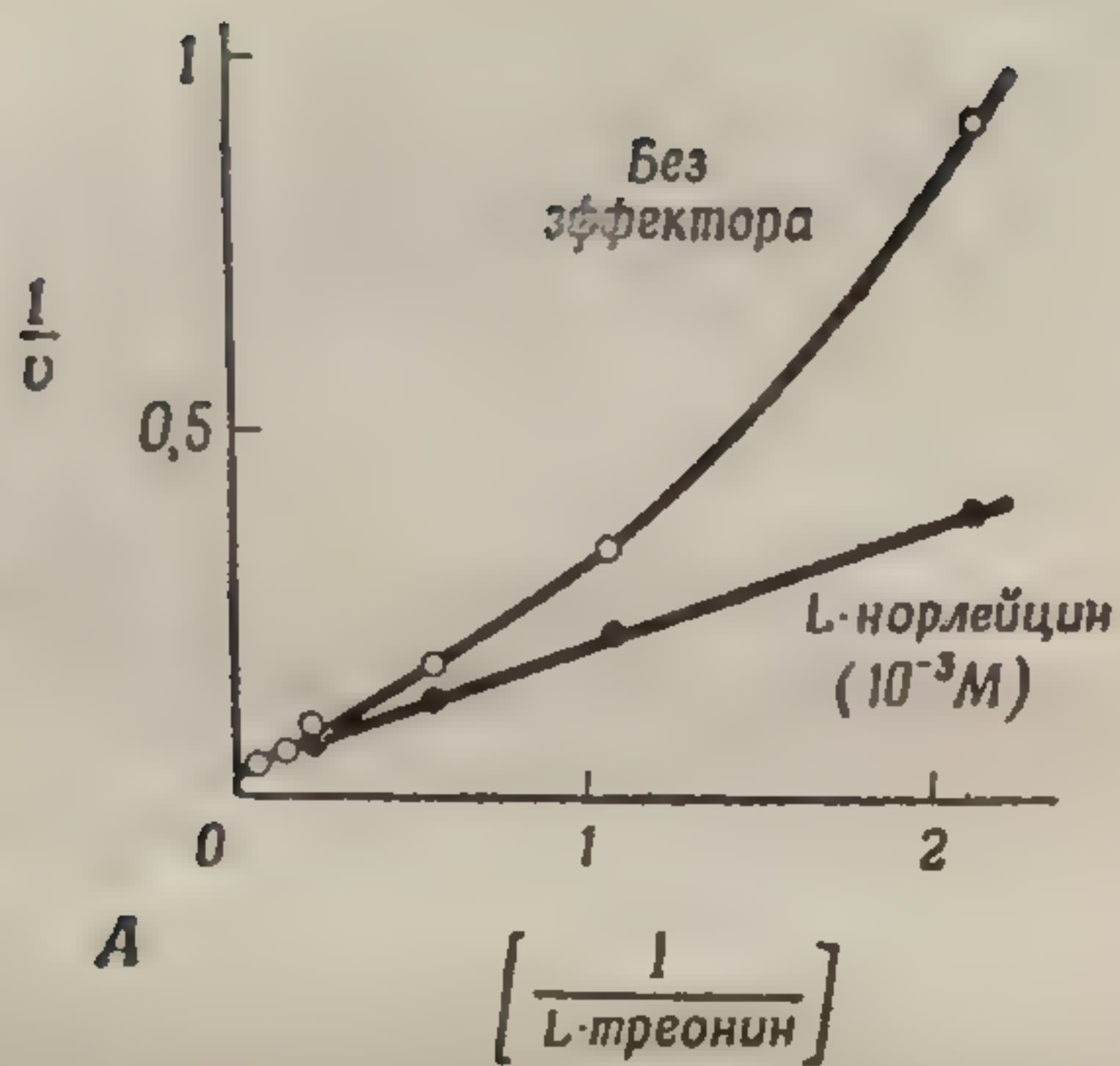
А и Б. Неупорядоченный механизм реакции. В и Г. Полностью упорядоченный механизм, при котором образование комплекса  $EA'$  необратимо [уравнение (IV.23)]. Д и Е. Упорядоченный механизм, при котором комплекс  $EA'$  образуется быстро и обратимо [уравнение (IV.23)]. В случаях А и Б прямые имеют общую точку пересечения, лежащую на горизонтальной оси, и наклоны их различны. В случаях В и Г прямые параллельны и, следовательно, не имеют точки пересечения.



же числом различных ферментов), часто называют кофакторами или коферментами (в зависимости от того, подвергаются ли они при данной ферментативной реакции регенерации или же химической трансформации). Для всех таких систем характерно, что кофактор или кофермент очень прочно связывается с ферментом. При изучении стационарной кинетики таких систем обычно бывает удобно для последующего математического анализа подбирать такие концентрации реагентов, чтобы реакция протекала «квазинеобратимо». В одном из следующих разделов мы увидим, что обратимость реакций можно использовать при изучении нестационарной кинетики для получения дальнейшей информации о пути реакции.

Значительно больше сведений о механизме ферментативной реакции дает изучение ее быстroteкущих стадий, т. е. отдельного фермент-субстратного «цикла». Возможность подобных исследований ограничивают до настоящего времени два фактора: 1) абсолютная скорость катализируемых ферментами реакций — «число оборотов» фермента обычно лежит в пределах  $10^2$  —  $10^4 \text{ сек}^{-1}$  и вследствие этого интервалы времени, в течение которых должны проводиться такого рода измерения, чрезвычайно малы; 2) наличие аналитических методов, с помощью которых можно было бы следить за элементарными реакциями (т. е. реакциями, состоящими из «одного события») при низких концентрациях соответствующих фермент-субстратных комплексов или соединений. Молярная концентрация раствора, содержащего около 5 мг фермента на 1 мл, составляет приблизительно  $10^{-4} \text{ М}$ . А в большинстве случаев и такое количество фермента слишком велико. Изучение кинетики быстroteкущих стадий требует применения методов, существенно отличающихся от тех, которыми пользуются при исследовании кинетики стационарного состояния. В прошлом внимание уделялось преимущественно исследованию кинетики стационарного состояния. Экспериментальные методы, применяемые при этих двух кинетических подходах, будут рассмотрены в следующих разделах.





Фиг. 34. Типичные графы концентраций субстрата и ингибитора.

А. Ориентировочный график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, построенный в отсутствие L-треонина. Б. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата в присутствии L-норлейцина (I, II, III) и L-треонина (IV) — в его присутствии (ΔТТФ) — при концентрации  $10^{-3} M$ .



## 6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕСКОЛЬКИХ ЦЕНТРОВ И РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Имеется много данных, свидетельствующих о существовании многоцентровых молекул ферментов (гл. V). В отличие от многих твердых неорганических катализаторов, у которых число активных центров неопределенно и может быть бесконечно большим, многоцентровые ферменты, как оказалось, содержат небольшое целое (скорее всего, четное) число идентичных или почти идентичных центров и по меньшей мере такое же число отдельных полипептидных цепей. Из многоцентровых белков наиболее обстоятельно изучен гемоглобин (гл. III). Его молекула состоит из четырех полипептидных цепей двух типов и четырех функционально активных остатков гема, содержащих железо. В этом отношении он резко отличается от одноцентрового кислородпереносящего белка миоглобина, состоящего из одной полипептидной цепи и одного остатка гема. Было показано, что в некоторых многоцентровых ферментах полипептидные субъединицы образованы одинаковыми последовательностями аминокислот. Каждый центр может быть построен из одной или нескольких полипептидных цепей. Так, например, в глицеральдегидфосфатдегидрогеназе на активную нативную молекулу фермента приходится четыре идентичные полипептидные цепи и четыре центра для связывания субстрата и кофермента. Во всех исследованных до сих пор дегидрогеназах обнаружено более одного центра

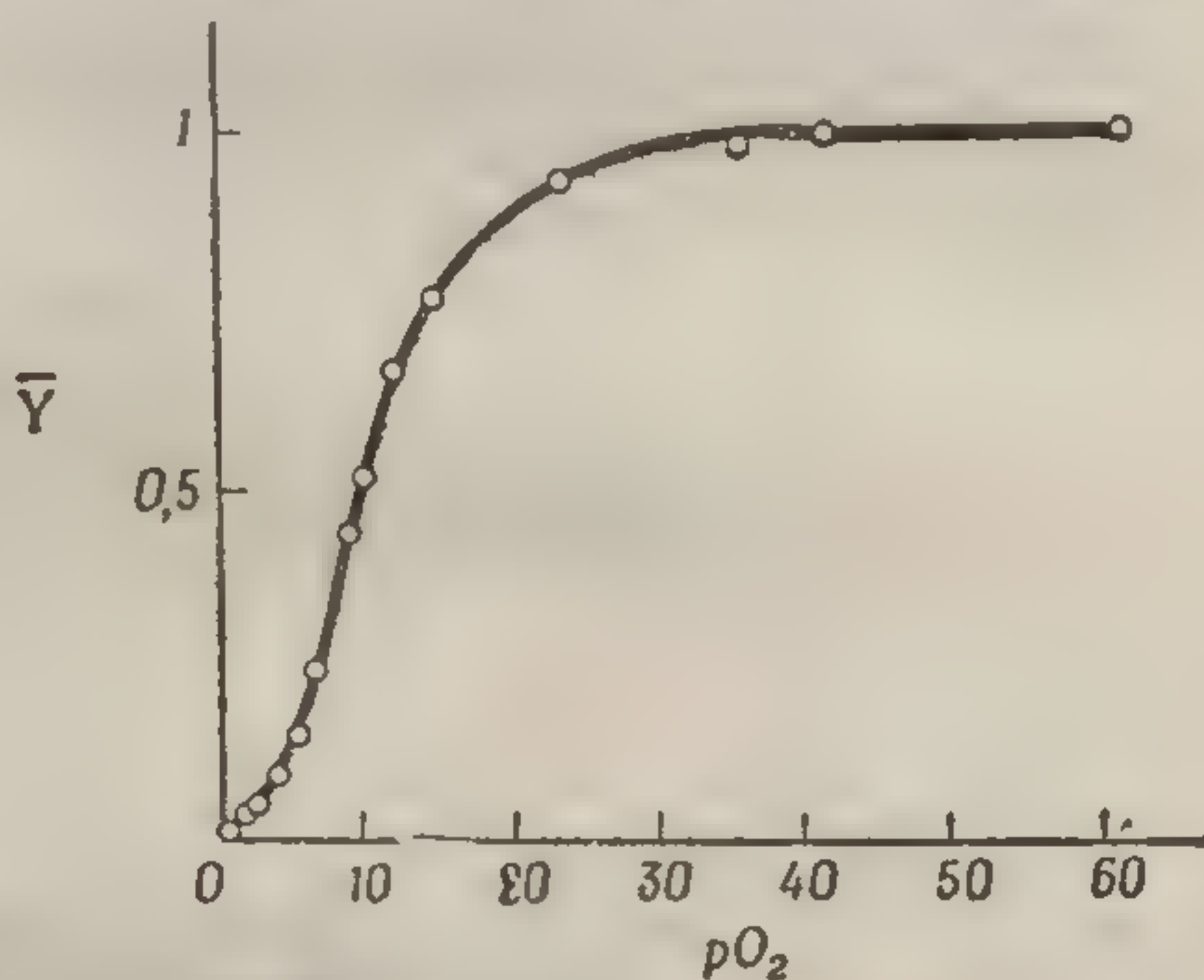
### ◀ Фиг. 34. Типичные графики зависимости скорости реакции от концентраций субстрата и эффектора в аллостерических ферментных системах.

А. Ориентировочный график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, построенный в соответствии с уравнением (IV. 5); график описывает дезаминирование L-треонина, катализируемое L-треониндезаминазой, в отсутствие и в присутствии L-норлейцина, действующего как положительный эффектор. Б. Зависимость скорости реакции от концентрации L-изолейцина, действующего как отрицательный модификатор активности треониндезаминазы. Кривые I, II, III — в отсутствие положительного эффектора L-норлейцина, кривая IV — в его присутствии. В. Зависимость активности дезоксицитидиндезаминазы от концентрации положительного эффектора — дезоксицитидинтрифосфата (дЦТФ) — при различных концентрациях отрицательного эффектора — дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) — и фиксированной концентрации субстрата (дЦМФ).



(и более одной полипептидной цепи) на активную молекулу фермента.

До сих пор мы принимали, что все каталитические центры независимы по отношению друг к другу. Однако накопилось уже много кинетических данных, указывающих на важную роль взаимодействий между центрами



Фиг. 35. Зависимость степени насыщения гемоглобина кислородом ( $\bar{Y}$ ) от давления кислорода ( $pO_2$ ).

Условия: 4,6%-ный раствор гемоглобина в 0,6 М фосфатном буфере (pH 7) при 19°.

в механизме регуляции активности ферментов. Для таких регуляторных многоцентровых ферментов характерно то, что при определенных условиях зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, ингибитора или активатора не совпадает с зависимостью, предсказываемой общим уравнением (IV. 15). В этих случаях скорость реакции сильнее зависит от концентрации субстрата, ингибитора или активатора, чем это допускается моделью (IV. 15). Поведение, типичное для подобных систем, показано на фиг. 34. Действительно, такого рода концентрационная зависимость более высокого порядка наблюдается для связывания кислорода гемоглобином (фиг. 35), но не миоглобином. Поскольку структура гемоглобина изучена намного лучше, чем структура любого из этих ферментов, естественно, что многие представления о механизме регуляции активно-



сти многоцентровых ферментов опирались на результаты изучения гемоглобина. Пожалуй, наиболее удивительный факт, касающийся связывания кислорода гемоглобином, заключается в том, что и скорости и равновесия, наблюдаемые в процессе связывания, зависят от того, какая доля центров связывания уже оксигенирована: по мере увеличения числа центров связывания, содержащих кислород, скорость связывания кислорода возрастает, а константа диссоциации комплекса гем — кислород уменьшается. Поразительно то, что расстояние между четырьмя остатками гема в нативной молекуле настолько велико, что они не могут оказывать какого-либо непосредственного влияния друг на друга (см. описание детальной структуры гемоглобина в гл. III). Отсюда с неизбежностью следует, что «связывание кислорода одной группой гема влияет на конфигурацию комплекса гем—полипептид и тем самым оказывает влияние на конформацию трех соседних гем-полипептидных цепей». Гауровиц (в 30-х годах) первым показал, что при оксигенировании гемоглобина его конформация должна изменяться; он заметил, что кристаллы гемоглобина разрушались при оксигенировании. Различие в структурах гемоглобина и миоглобина еще сильнее оттеняется тем фактом, что в нативном миоглобине и в изоцианидном комплексе миоглобина (в котором изоцианид несет ту же химическую функцию, что и кислород в оксигенированном миоглобине) конформации полипептидной цепи неразличимы. В то же время из данных кристаллографического определения структуры оксигенированного и дезоксигенированного гемоглобина известно, что в этих двух типах кристаллов полипептидные субъединицы располагаются по-разному.

Во многих случаях молекулы, не сходные стереохимически с субстратом, изменяют скорость ферментативного катализа. Ряд таких *эффекторов* приведен в табл. 12. Одни из них действуют как ингибиторы ферментативного катализа, другие — как активаторы. Хотя эти эффекторы иногда явно далеки от субстрата по химической структуре, они обычно представляют собой звенья одной общей цепи метаболических реакций. До-



вольно часто встречается ситуация, когда продукт реакции, представляющей более позднее звено в цепи биосинтеза, действует как эффектор фермента, участвующего в той же цепи на более ранней стадии. Иногда сам субстрат может служить эффектором ферментативного катализа, т. е. присоединение субстрата к одному центру фермента может способствовать переходу других центров фермента в каталитически активную форму. В иных случаях субстрат не влияет на каталитическую активность остальных центров фермента.

Таблица 12

Аллостерические системы <sup>1)</sup>

Фермент	Субстраты	Эффекторы	
		ингибиторы	активаторы
L-треониндезаминаза	L-треонин	L-изолейцин	L-валин
Аспартаттранскарбамилаза	L-аспартат, карбамилфосфат	Цитидинтрифосфат	АТФ
Аминогидролаза дезоксицитидиловой кислоты	Дезоксицитидиловая кислота	Дезокситимидиловая кислота	Дезоксицитидинтрифосфат
Изоцитратдегидрогеназа	D-изоцитрат, НАД	-	5'-адениловая кислота, $Mg^{2+}$
Гемоглобин	$O_2$	-	-
Фосфорилаза	Глюкозо-1-фосфат, неорганический фосфат, гликоген	АТФ	5'-адениловая кислота
Фруктозо-1,6-дифосфатаза	Фруктозо-1,6-дифосфат	5'-адениловая кислота	-

<sup>1)</sup> Жирным шрифтом выделены субстраты и эффекторы, для которых наблюдаются кооперативные взаимодействия.

Один из возможных механизмов взаимодействия многих центров, предложенный Моно, Уаймэном и Шанжё, схематически изображен на фиг. 36. В основе этой гипотезы лежит допущение, что многоцентровый фермент может существовать по меньшей мере в двух состояниях, причем конформации всех субъединиц в одном агрегате идентичны.

Роль эффектора сводится к смещению равновесия в сторону одного или другого из этих упорядоченных



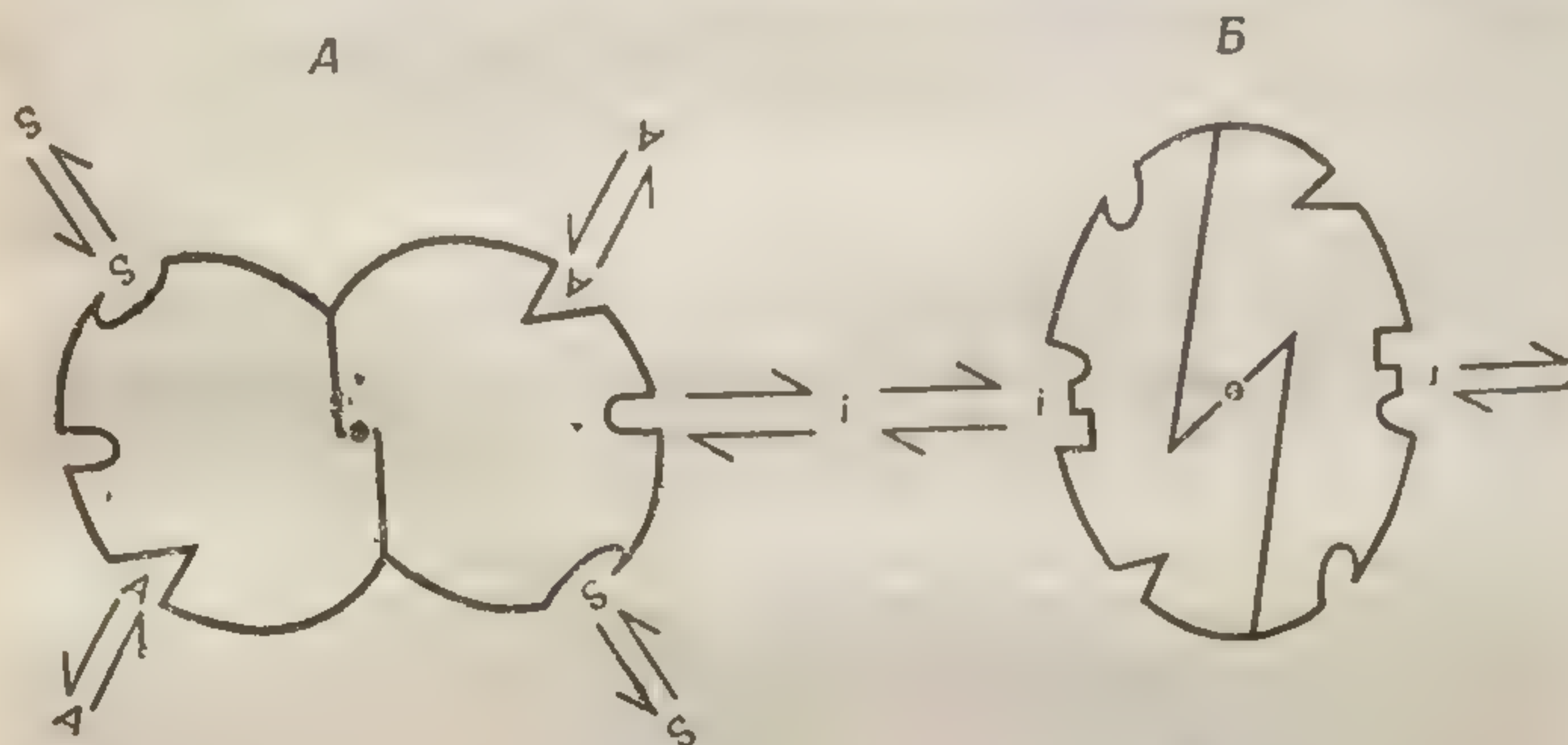
Фиг. 36. Модель в аллостерической системе

А. Оба протомера в равновесии с субстратом S и ингибитором I. Б. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. В. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Г. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Д. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Е. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Ж. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. З. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. И. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. К. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Л. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. М. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Н. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. О. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. П. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Р. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. С. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Т. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. У. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Ф. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Х. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Ц. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Ч. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Ш. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Щ. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Ъ. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Ы. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Ь. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Э. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Ю. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта. Я. Аллостерический эффект отрицательного эффекта метрического смешанного эффекта.

и состояния с активаторами; сторону каталитическими ингибиторами. из них взаимостерическом субстрата путем



агрегированных состояний путем образования комплекса за счет связывания эффектора особым аллостерическим центром. Эффекторы, смещающие равновесие в направлении образования каталитически активного состояния



Фиг. 36. Модель симметричных многоцентровых взаимодействий в аллостерической ферментной системе (J. P. Changeux, Brookhaven Symposium, см. список литературы к гл. VIII).

А. Оба протомера в каталитически активном состоянии (состояние  $R$ ). Связывание субстрата  $S$  или положительного эффектора  $A$  стабилизирует это состояние. Б. Аллостерически ингибированное состояние (состояние  $T$ ). Связывание отрицательного эффектора  $I$  стабилизирует это состояние. Из соображений симметрии смешанное состояние  $T-R$  исключается. Основные положения, на которых базируется модель, состоят в следующем: 1) аллостерические белки являются олигомерами, в которых протомеры ассоциированы так, что все они занимают эквивалентные положения. Это означает, что молекула обладает по меньшей мере одной осью симметрии; 2) каждому лиганду, способному образовывать стереоспецифический комплекс с белком, соответствует один и только один центр на каждом протомере; 3) конформация каждого протомера напряжена вследствие его ассоциации с другими протомерами; 4) аллостерические олигомеры могут существовать по крайней мере в двух состояниях, находящихся в равновесии. Эти состояния различаются по распределению и(или) энергии связей между протомерами, а следовательно, и по ограничениям, накладываемым на конформацию протомеров; 5) вследствие этого при переходе из одного состояния в другое сродство одного (или нескольких) стереоспецифических центров к соответствующему лиганду изменяется; 6) при переходе белка из одного состояния в другое симметрия молекулы сохраняется (в том числе и симметрия ограничений, накладываемых на конформацию каждого протомера).

и состояния с высоким сродством к субстрату, являются активаторами; те же, которые смещают равновесие в сторону каталитически неактивного состояния, являются ингибиторами. Существует два типа ингибиторов: одни из них взаимодействуют с полипептидной цепью в аллостерическом центре, другие блокируют связывание субстрата путем конкурентного ингибирования в центре



связывания субстрата. Если сам субстрат является эффектором, то молекулы, действующие как конкурентные ингибиторы в условиях низкой концентрации субстрата (т. е. при таких концентрациях, когда только малая часть центров занята связанными молекулами субстрата) могут и активировать фермент, так как они также будут смещать равновесие в пользу каталитически активного состояния.

Если в одном из двух предсуществующих состояний имеет место сильное предпочтительное связывание субстрата или ингибитора, то связывание по одному-единственному центру может повлиять на каталитическое состояние всей совокупности центров в сложной молекуле. В силу этого зависимость скорости реакции от концентрации субстрата или ингибитора может быть более сильной, чем зависимость первого порядка, вопреки тому, чего позволяет ожидать уравнение (IV.15), но в соответствии со многими экспериментальными данными, например с теми, что изображены на фиг. 34.

Интересным примером кооперативной «многоцентральной кинетики» такого типа служит реакция изоцитрата с никотинамидадениндинуклеотидом (НАД). Было показано, что эта реакция катализируется ферментом, содержащим четыре центра для субстрата и два центра для аллостерического эффектора. Многообразие взаимодействий многих центров в этой системе фермент—субстрат—эффектор иллюстрирует следующая цитата из работы Аткинсона с сотрудниками: «Реакция, катализируемая дрожжевой НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназой, является реакцией четвертого порядка по концентрации изоцитрата и второго порядка по концентрации НАД,  $Mg^{2+}$  и аденозин-5'-фосфата (АМФ). В разбавленных системах кинетика реакции выражается уравнением одиннадцатого порядка».

## 7. МЕТОДЫ КИНЕТИКИ СТАЦИОНАРНОГО СОСТОЯНИЯ

Для изучения кинетики стационарного состояния применяют методы, позволяющие следить за изменением концентрации реагента или продукта во времени. Обычно фактически измеряемой экспериментальной переменной

является кон-  
центрация  
данта. Для та-  
кого различия  
ности от изучаем-  
из них оказате-  
ль немногие пр-  
кое распростран-

## Спектр

В реакциях, гр-  
ской точки зрения  
часто сопровожда-  
ниями. Эти изм-  
жены в ультрафио-  
(т. е. областях, со-  
дам). Изменения  
регистрировать пр-  
субстрата. В выс-  
ством при спектре  
интенсивные и ха-  
поглощения, при  
продукта, образу-  
реакции, часто от-  
пающего в реакц-  
ния спектра по-  
хорошим индикат-  
реакции. Типичн-  
вых, полученных  
представлен на ф-

Ф.  
Для изучения  
по существу те ж-  
вместо поглощен-  
кулами, возбужден-  
товой энергии. Ми-  
флуоресценцией. К-  
сканир-  
зм



является какое-либо физическое или химическое свойство, зависящее от концентрации реагента и(или) продукта. Для таких измерений могут быть использованы самые разнообразные аналитические методы в зависимости от изучаемых субстратов и продуктов. Некоторые из них оказались особенно полезными. Мы обсудим лишь немногие процедуры, получившие наиболее широкое распространение.

### Спектрофотометрические методы

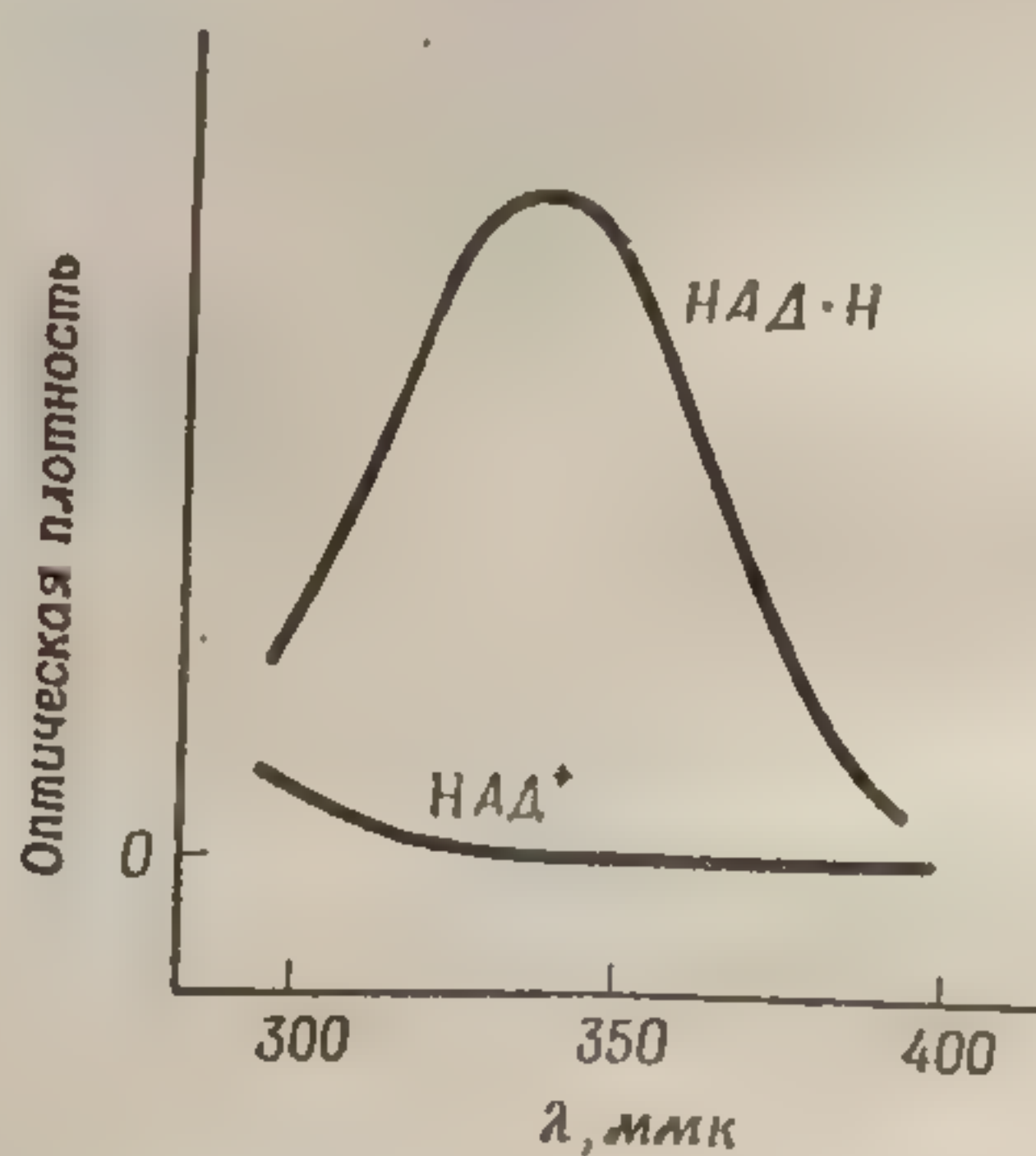
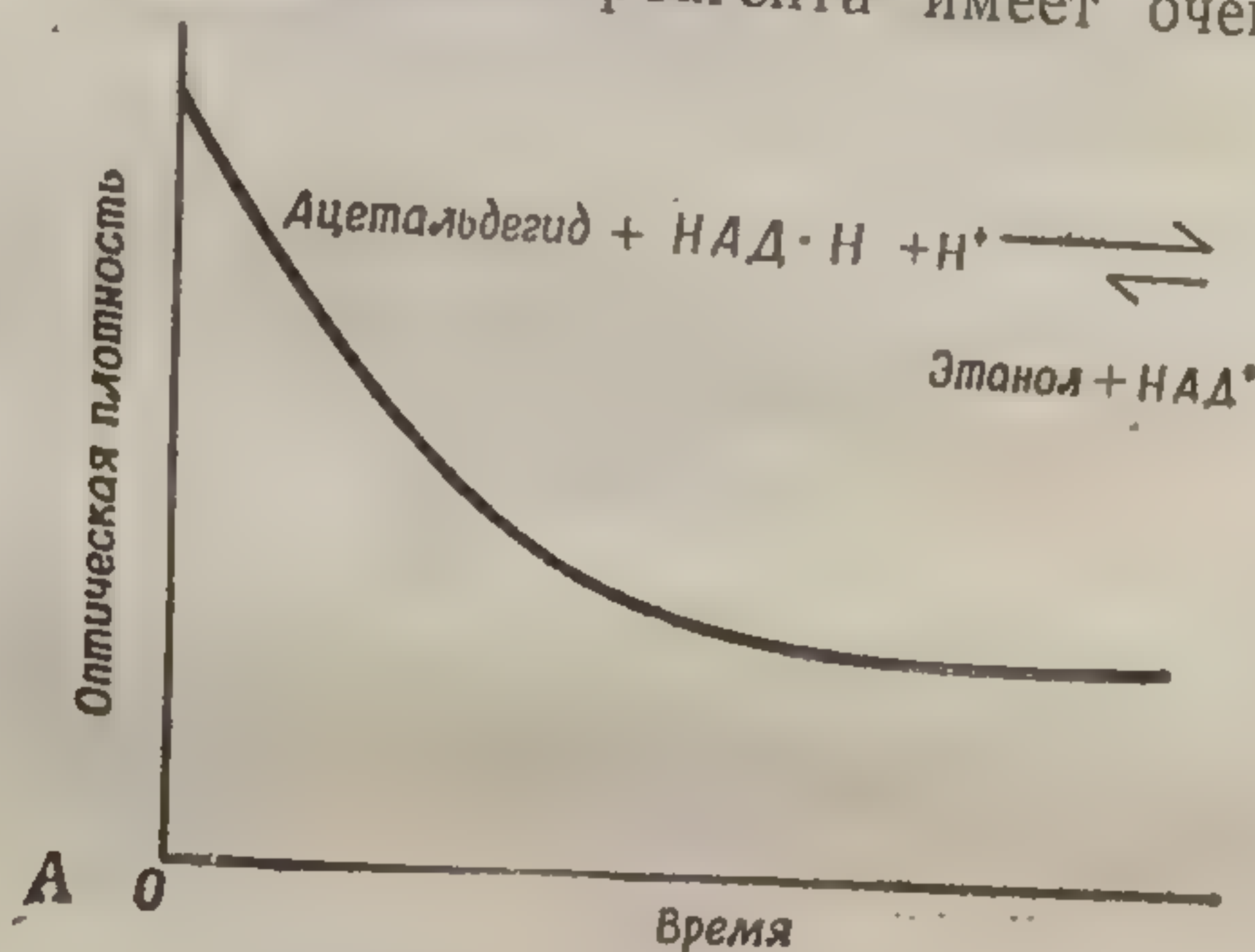
В реакциях, представляющих интерес с биологической точки зрения, превращение реагентов в продукты часто сопровождается заметными спектральными изменениями. Эти изменения обычно наиболее ярко выражены в ультрафиолетовой и видимой областях спектра (т. е. областях, соответствующих электронным переходам). Изменения спектров поглощения часто удается регистрировать при относительно низких концентрациях субстрата. В высшей степени выигрышным обстоятельством при спектрофотометрических измерениях являются интенсивные и характерные ультрафиолетовые спектры поглощения, присущие многим *коферментам*. Спектр продукта, образующегося из кофермента в результате реакции, часто отличается от спектра кофермента, вступающего в реакцию. Вследствие этого скорость изменения спектра поглощения кофермента может служить хорошим индикатором общей скорости ферментативной реакции. Типичный пример спектрофотометрических кривых, полученных с целью изучения кинетики реакции, представлен на фиг. 37.

### Флуоресцентные методы

Для изучения спектров флуоресценции применяются по существу те же спектрофотометрические методы, но вместо поглощения измеряется испускание света молекулами, возбужденными в результате поглощения световой энергии. Многие коферменты обладают сильной флуоресценцией. Как показывает фиг. 38, спектр испускания можно измерять при крайне низких концентрациях таких молекул.



При кинетических исследованиях возможность следить за изменением концентраций при очень низких начальных концентрациях реагента имеет очень важное



Фиг. 37.

А. Изменение оптической плотности при 340 мμ, сопровождающее восстановление алькоголдегидрогеназой ацетальдегида (находящегося в избытке) в присутствии восстановленного НАД в условиях стационарности. При бесконечной длительности протекания реакции оптическая плотность остается конечной вследствие обратимости реакции.

Б. Спектры поглощения НАД<sup>+</sup> и НАД·Н.

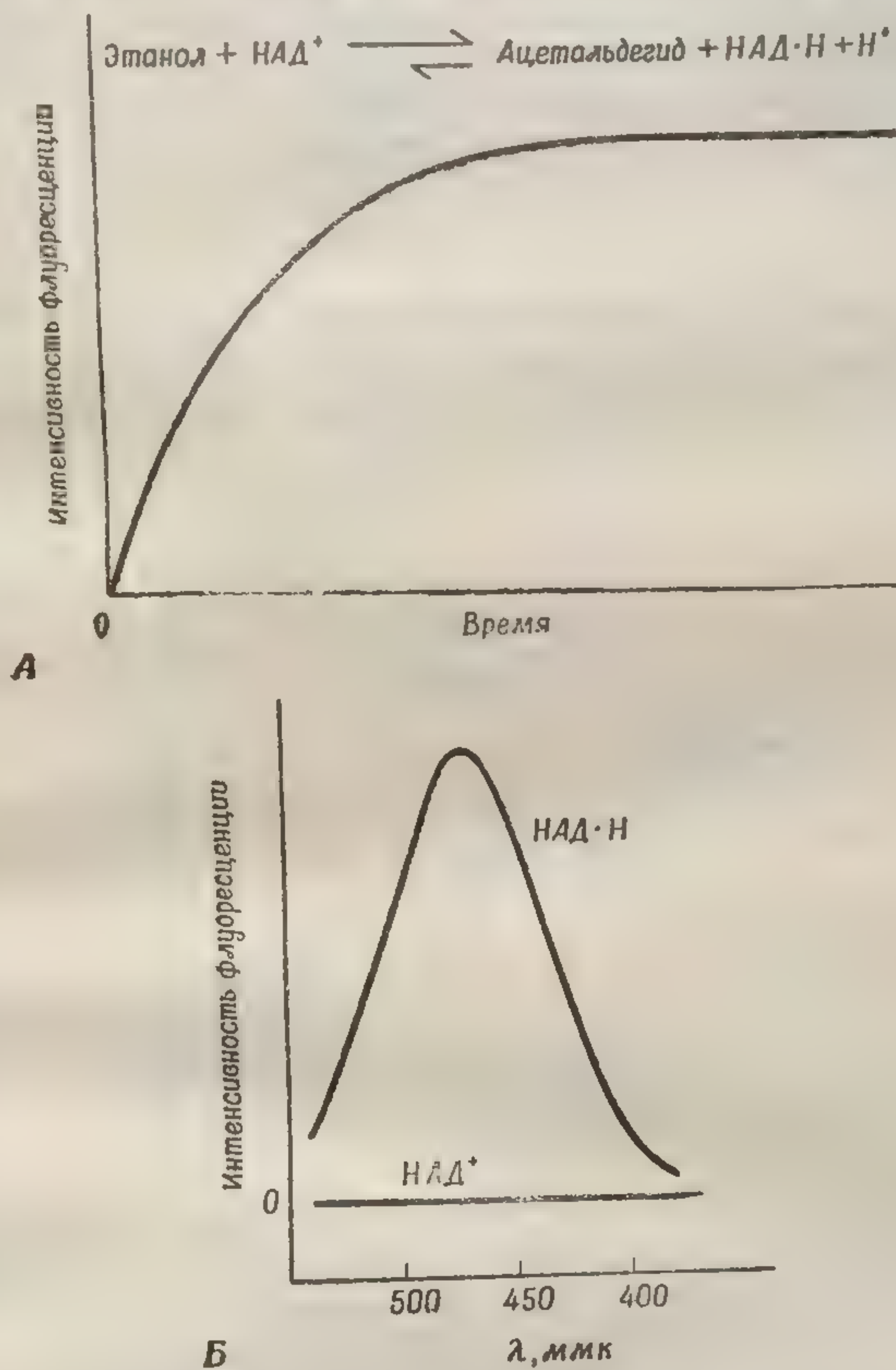
значение (не говоря о том, что требуемый субстрат иногда трудно достать или он очень дорог). Для измерения таких параметров, как  $K_M$  или  $K_I$ , необходимо

А. Окисление спир-  
ценции при 436 м  
новленным ко

битору очен  
малы; поз



изучать реакции в области концентраций  $[S] \approx K_M$  или  $[I] \approx K_I$ . Если сродство фермента к субстрату или инги-



Ф и г. 33.

А. Окисление спирта в присутствии кофермента НАД<sup>+</sup>, измеряемое по флуоресценции при 436 мкм, испускаемой образующимся в процессе реакции восстановленным коферментом. Б. Спектры флуоресценции НАД<sup>+</sup> и НАД·Н.

битору очень велико, значения  $K_M$  и(или)  $K_I$  очень малы; поэтому, для того чтобы оценить эти параметры,







реакционной смеси, обладающей малой буферной емкостью. Устройство для поддержания постоянного рН (рН-стат) схематически изображено на фиг. 39. Так как большинство ферментов обладает оптимальной активностью при низких концентрациях ионов водорода (в области рН 5—9), то этим методом можно улавливать небольшие изменения концентрации ионов водорода, а следовательно, и субстрата.

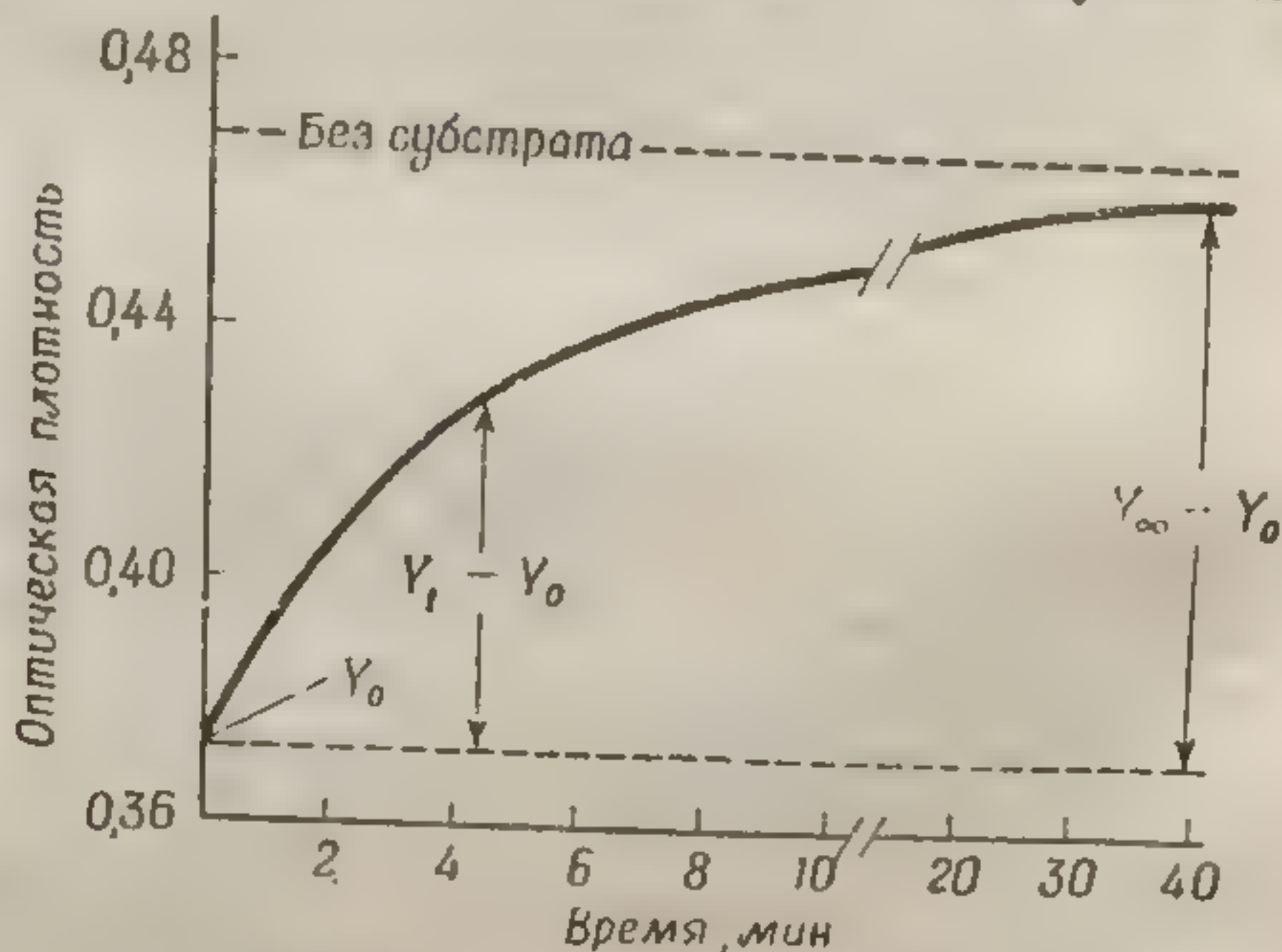
### Индикаторные методы

Если в ходе ферментативной реакции реагент и(или) продукт могут быстро и обратимо взаимодействовать с каким-либо посторонним веществом, имеющим интенсивный спектр поглощения, то изменения спектра этого вещества, зависящие от  $[S]$  и(или)  $[P]$ , могут быть использованы для индикации химической реакции. При этом неперемное условие состоит в том, чтобы скорость реакции между «индикатором» и реагентом и(или) продуктом была намного выше общей скорости процесса  $S \rightarrow P$ . Кроме того, необходимо, чтобы индикатор не оказывал заметного влияния на скорость реакции и чтобы его концентрация была достаточно низкой по сравнению с концентрацией субстрата (т. е. чтобы  $[S] - [S \cdot \text{Индикатор}] \approx [S]_{\text{общ}}$ , если речь идет об индикаторе концентрации субстрата). Как кислотно-основные, так и окислительно-восстановительные индикаторы часто удовлетворяют этим требованиям. Индикаторный метод может также быть использован для измерения образования продукта, даже если индикатор реагирует с продуктом необратимо, но лишь при условии, что скорость каталитической реакции мала по сравнению со скоростью реакции между индикатором и продуктом.

Недавно были развиты методы, позволяющие следить за изменениями в активном центре фермента в ходе катализа при помощи индикаторов, являющихся конкурентными ингибиторами. В таких методах обычно измеряют очень малые концентрации фермента, наблюдая за обратимыми комплексами индикатора с центром фермента по изменению спектров поглощения или испускания (флуоресценции). Как показано на фиг. 40, из наблюдаемой интенсивности поглощения или испускания



можно вычислить концентрации комплекса EI и E, если из экспериментов в отсутствие субстрата известна  $K_I$ . В присутствии субстрата уменьшение концентрации EI может быть экстраполировано, как показано, к нулевому времени, что позволяет определить  $K_M$ . Максимальную скорость ( $V_{\max}$ ) можно определить из изменения интенсивности во времени, пользуясь интеграль-



Фиг. 40. Изменение степени связывания фермента с конкурентным ингибитором — профлавином — при реакции гидролиза трипсином бензоил-L-аргининамида (рН 7,3; 25°).

Поглощение света при 480 мкм обусловлено образованием комплекса фермент-профлавин. По мере протекания реакции концентрация фермент-субстратного комплекса уменьшается; при этом растет доля фермента, связанного с конкурентным ингибитором, вследствие чего оптическая плотность увеличивается. Если известны коэффициент поглощения и константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор, то константу  $K_M$  можно найти, исходя из оптической плотности в нулевой момент времени  $Y_0$ . Величины  $K_M$  и  $V_{\max}$  можно также найти обычным образом из графика  $1/v$  как функции  $1/[S]$ .

ной формой уравнения скорости реакции (разд. 8). Во многих случаях требуемый индикатор такого типа удается синтезировать, присоединяя интенсивный хромофор к органической структуре, являющейся специфическим конкурентным ингибитором определенного фермента.

#### Методы, основанные на измерении оптического вращения

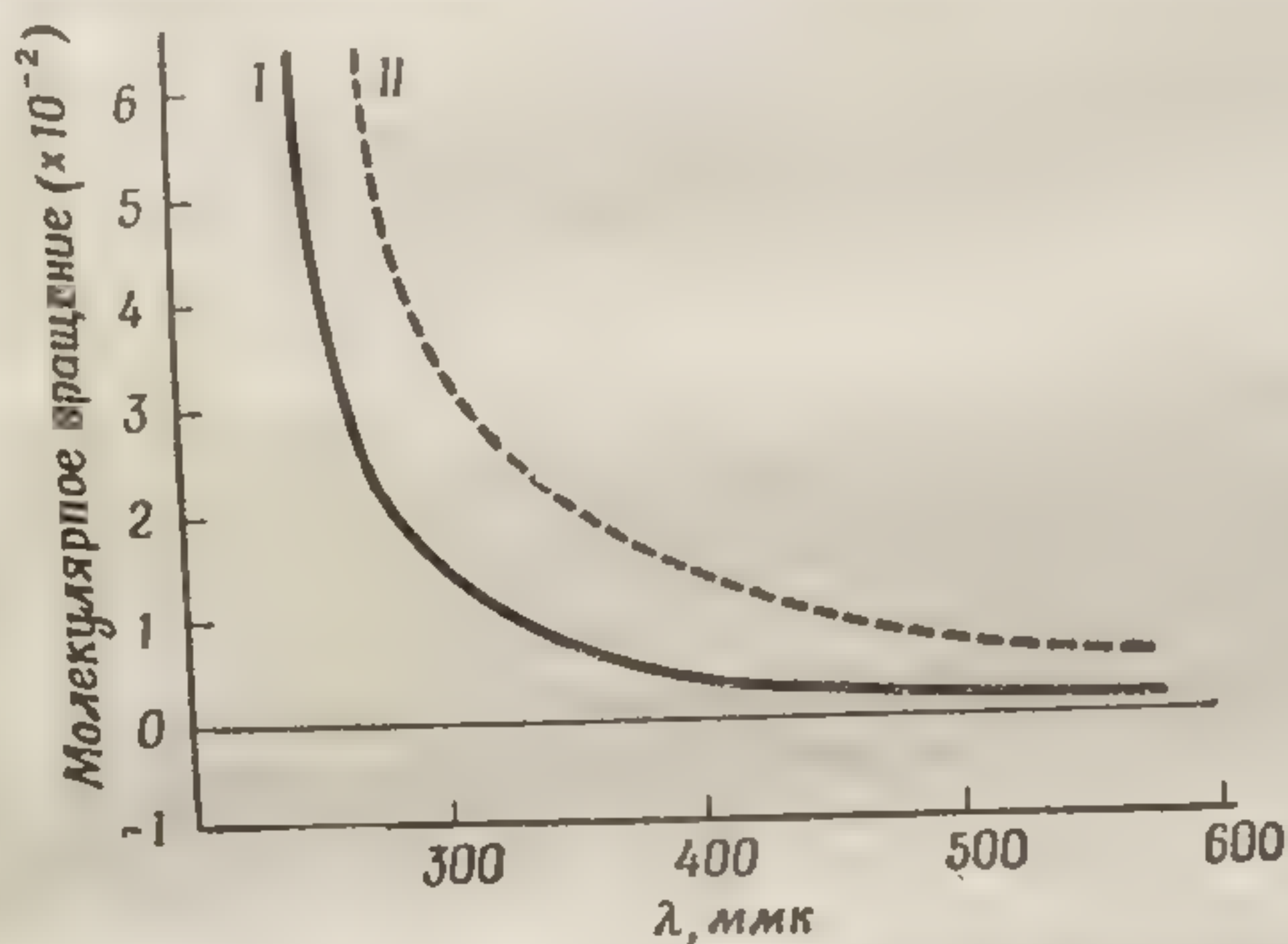
Почти все биологические реагенты и продукты оптически активны, т. е. содержат асимметрические тетраэд-

Фиг. 41. Типичная волна плоскополяризованного света (один асимметрический центр)

физического свойства. Изменение оптического вращения происходит в результате химического превращения вещества. Вращение оптически активного вещества к такому реакционному состоянию легко доступно. Частичное вращение волны падает на хромофор. Частичное оптическое вращение, проводимое оптически, можно по-



рические атомы углерода. Величина оптического вращения таких молекул зависит от электронной структуры заместителей при асимметрическом атоме углерода. В принципе любая биологическая реакция с участием асимметрического субстрата сопровождается изменением оптического вращения. Многие ранние, ныне классические, эксперименты по кинетике ферментативных реакций были выполнены с использованием именно этого



Фиг. 41. Типичная зависимость оптического вращения от длины волны плоскополяризованного света для нехромофорных субстратов. I — L-аланин (один асимметрический атом углерода); II — L-изолейцин (два асимметрических атома углерода).

физического свойства. Однако часто для того, чтобы изменение оптического вращения было измеримым, требуется химическая трансформация значительного количества вещества. Поэтому методы, основанные на измерении оптического вращения, обычно применимы лишь к таким реакциям, для которых и фермент и субстрат легко доступны в больших количествах. Величина оптического вращения для данного вещества меняется с длиной волны падающего на него поляризованного монохроматического света (дисперсия оптического вращения). Чаще всего с уменьшением длины волны оптическое вращение увеличивается (фиг. 41). Следовательно, проводя измерения в ультрафиолетовой области, можно повысить чувствительность метода. Ртутная



лампа и соответствующий фильтр или монохроматор позволяют получить подходящую для этих целей интенсивность монохроматического света.

### Методы прямого химического анализа

В отличие от описанных выше методов, позволяющих проводить непрерывное прямое наблюдение за течением реакции, любой метод прямого химического анализа реагентов или продуктов требует отбора проб из реакционной смеси по ходу кинетических измерений. В каждой отдельной пробе нужно моментально останавливать катализируемую реакцию путем инактивации фермента, проводя это в условиях, не влияющих на концентрации субстрата и продукта. Ясно, что, где это возможно, лучше использовать методы непрерывных наблюдений.

### 8. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ, ПОЛУЧАЕМЫХ ПРИ ИЗУЧЕНИИ КИНЕТИКИ СТАЦИОНАРНОГО СОСТОЯНИЯ

Существует два метода анализа экспериментальных данных, характеризующих кинетику фермент-субстратных систем. Один из них основан на использовании дифференциальной формы уравнения скорости реакции [например, уравнение (IV.5)], другой — на использовании интегральной формы. Если реакция обратима или если продукт ингибирует реакцию, то желательно использовать дифференциальную форму выражения для скорости реакции и применять экспериментальный метод, пригодный для измерения начальной скорости реакции  $v_0$  (в это время  $[S] = S_0$ ). Однако во многих случаях удобнее (вследствие недостаточной точности применяемого экспериментального метода) измерять более значительные изменения концентрации субстрата (или продукта) и применять интегральную форму уравнения скорости реакции. Если продукт ингибирует реакцию, то это зависящее от времени ингибирование должно быть отражено в дифференциальном выражении для скорости реакции до интегрирования. Вследствие этого аналитическая обработка данных о скорости реакции

с помощью интегральной формы уравнения получается более удобный пример обработки данных одной и той же ферментальной системы, что позволяет отметить, что оба значения кинетических констант выводятся из уравнений стационарного состояния

Но условие построения фермент-субстратной реакции является необходимым, требуемым для интегральной формы уравнения. Если концентрация  $ES$  не изменяется со временем, то измерение скорости реакции строгим и более точным методом, приложимость уравнения, является условием

При использовании интегральной формы уравнения строят график  $\ln \frac{S_0 - S}{S_0}$  от времени  $t$ . При  $S_0^{-1} = 0$  график получается линейным; при  $S_0^{-1} \neq 0$  график получается кривой. При изучении кинетики реакции с ингибитором также пользуются графиком  $\ln \frac{S_0 - S}{S_0}$  от  $t$ . Затем отк



с помощью интегрального уравнения оказывается значительно более сложной. Тем не менее этот метод применяется довольно часто. На фиг. 42 изображен интересный пример обработки экспериментальных данных для одной и той же фермент-субстратной системы как дифференциальным, так и интегральным методом. Следует отметить, что оба метода приводят к одним и тем же значениям кинетических параметров ( $K_M$  и  $k_P$ ). При выводе уравнений (IV.5), (IV.15) и (IV.24) предположение о стационарности выражалось математически условием

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0.$$

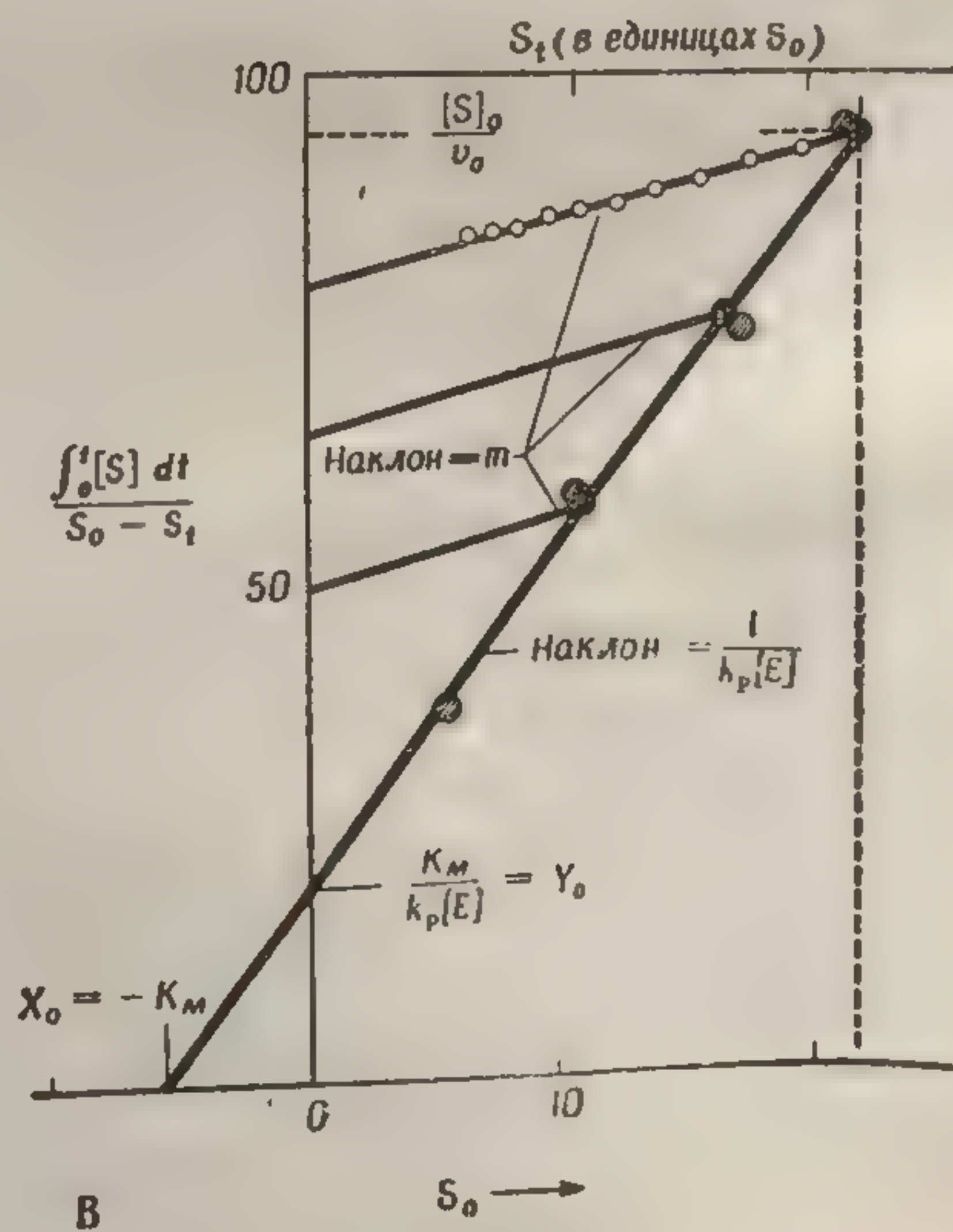
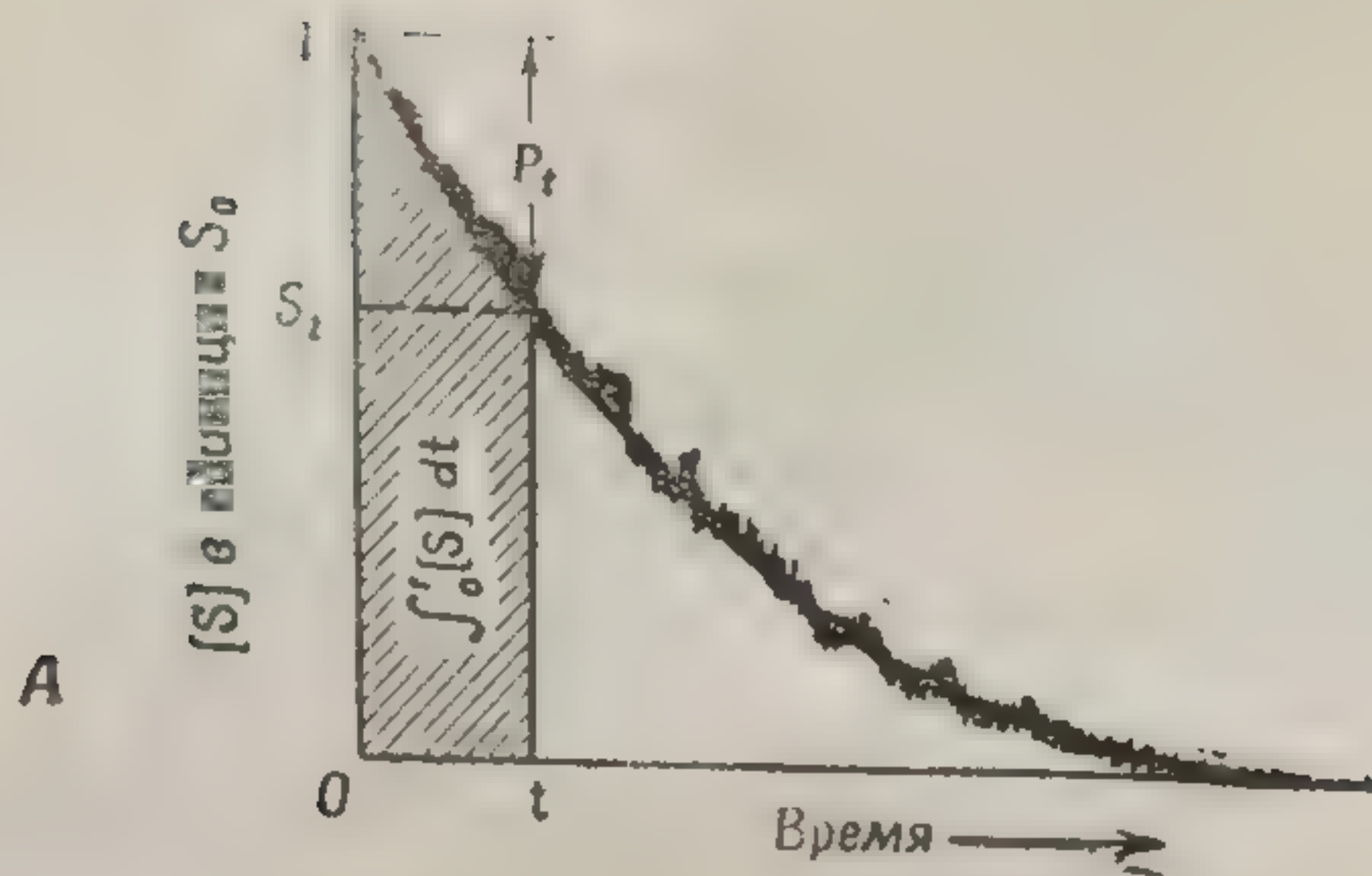
Но условие постоянства концентрации промежуточного фермент-субстратного комплекса (ES) на всем протяжении реакции явно невыполнимо: чтобы получить данные, требуемые для аналитического определения  $K_M$  из интегральной формы уравнения скорости реакции, концентрация ES должна существенно уменьшаться за время измерения в ходе одного эксперимента. Менее строгим и более разумным условием, обеспечивающим приложимость уравнений стационарной скорости реакции, является условие

$$\frac{d[S]}{dt} \gg \frac{d[ES]}{dt} \ll \frac{d[P]}{dt}. \quad (\text{IV. 27})$$

При использовании дифференциального метода обычно строят график зависимости  $v^{-1}$  от  $[S]^{-1}$ . Анализ этого графика на линейность и определение величины  $v_0^{-1}$  при  $S_0^{-1} = 0$  позволяют сделать предварительные выводы о природе самой реакции. Конечное значение  $v_0$  при  $S_0^{-1} = 0$  указывает на насыщение фермента субстратом; линейность говорит о том, что система описывается моделями типа модели Михаэлиса—Ментен.

При изучении ингибирования каталитических реакций также полезно строить сначала графики зависимости  $v_0^{-1}$  от  $S_0^{-1}$  при различных концентрациях ингибитора. Затем откладывают значения  $v_0^{-1}$  при  $S_0^{-1} = 0$  как





функцию  
стно эти д  
неконкуре  
Тот же  
действия  
рительный  
случае ж  
реакции п  
страта ( $S$   
Линейнос  
значения  
гого субс  
как функ  
ществует

◀ Фиг. 42.

А. Кривая,  
начальной  
скорость р  
фике пров

[где  $K_p$  —  
щая  $K_1$  в  
перимента  
лучены с  
(зависяще  
ном гидро  
основании  
строить в  
определи  
 $t$   
 $\int_0^t [S] dt$  ч  
параллель  
нию  $S_0$ . О  
соответств

Светлые к  
ствием а



функцию концентрации ингибитора. Анализируя совместно эти два графика, можно различить конкурентный и неконкурентный типы ингибирования.

Тот же метод, который используется при изучении действия ингибиторов, может применяться как предварительный при изучении двусубстратных реакций. В этом случае желательно исследовать начальную скорость реакции при фиксированной концентрации одного субстрата ( $S_1$ ) и варьировать концентрацию другого ( $S_2$ ). Линейность или нелинейность зависимости  $v^{-1}$  от  $S_2^{-1}$ , значения  $K_M^1$  и  $K_M^2$  при различных концентрациях другого субстрата и графики величины  $v_0^{-1}$  при  $S_1^{-1} \rightarrow 0$  как функции концентрации  $S_2$  помогают установить, существует или отсутствует упорядоченный путь реакции,

◀ Фиг. 42. Различные методы определения  $K_M$  (К. А. Booman and C. Niemann, J. Am. Chem. Soc., 77, 5733, 1955).

А. Кривая, иллюстрирующая весь ход реакции во времени при определенной начальной концентрации субстрата  $S_0$ . Б. Кривая, изображающая начальную скорость реакции (шкала времени растянута). Плавная линия на первом графике проведена в соответствии с тем набором параметров интегральной формы уравнения Михаэлиса — Ментен

$$k_p E_0 t = (K_M + S_0) \ln \left\{ \frac{S_0}{S_0 - P_t} \right\} + P_t \left( 1 - \frac{K_M}{K_p} \right)$$

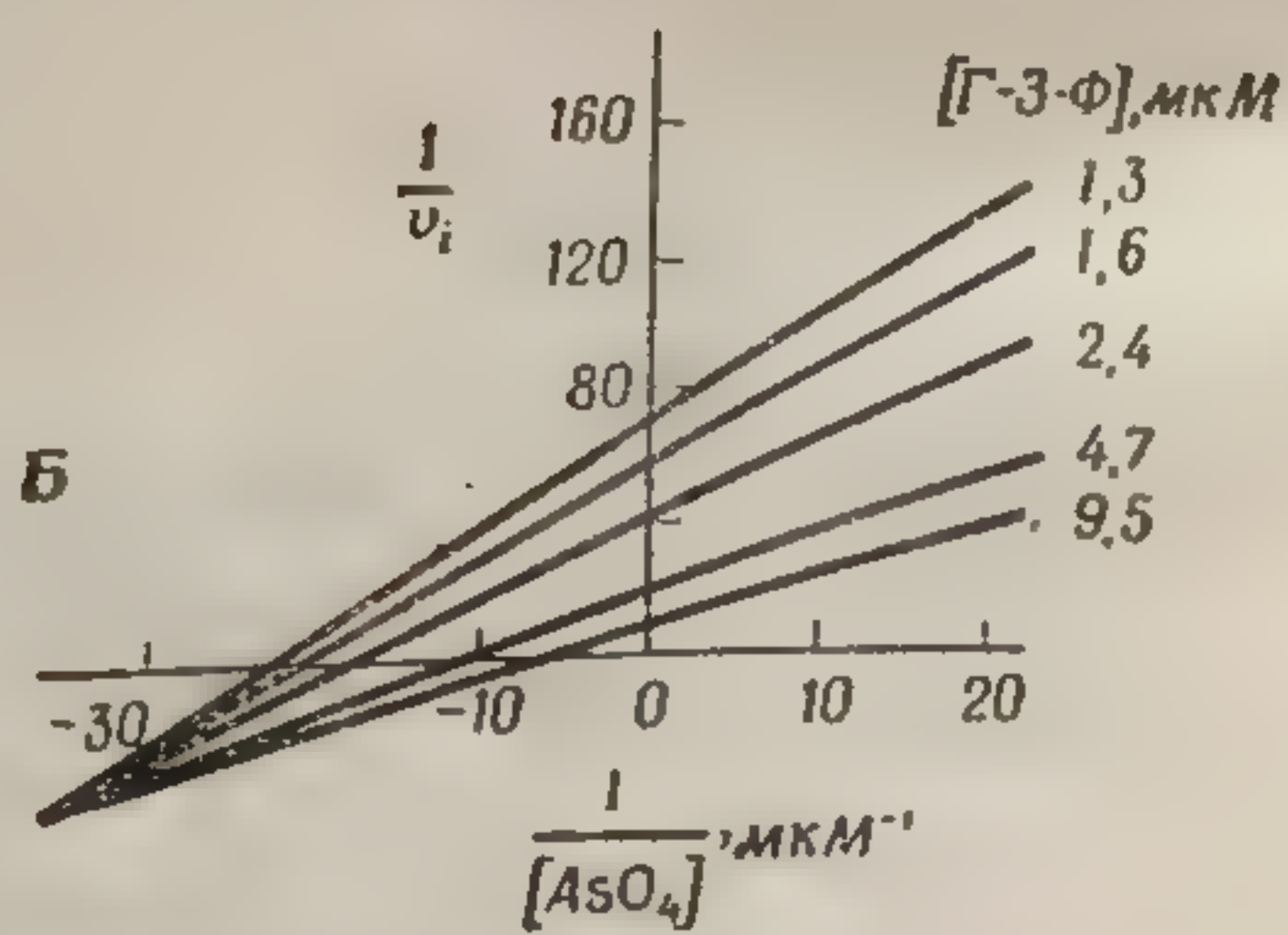
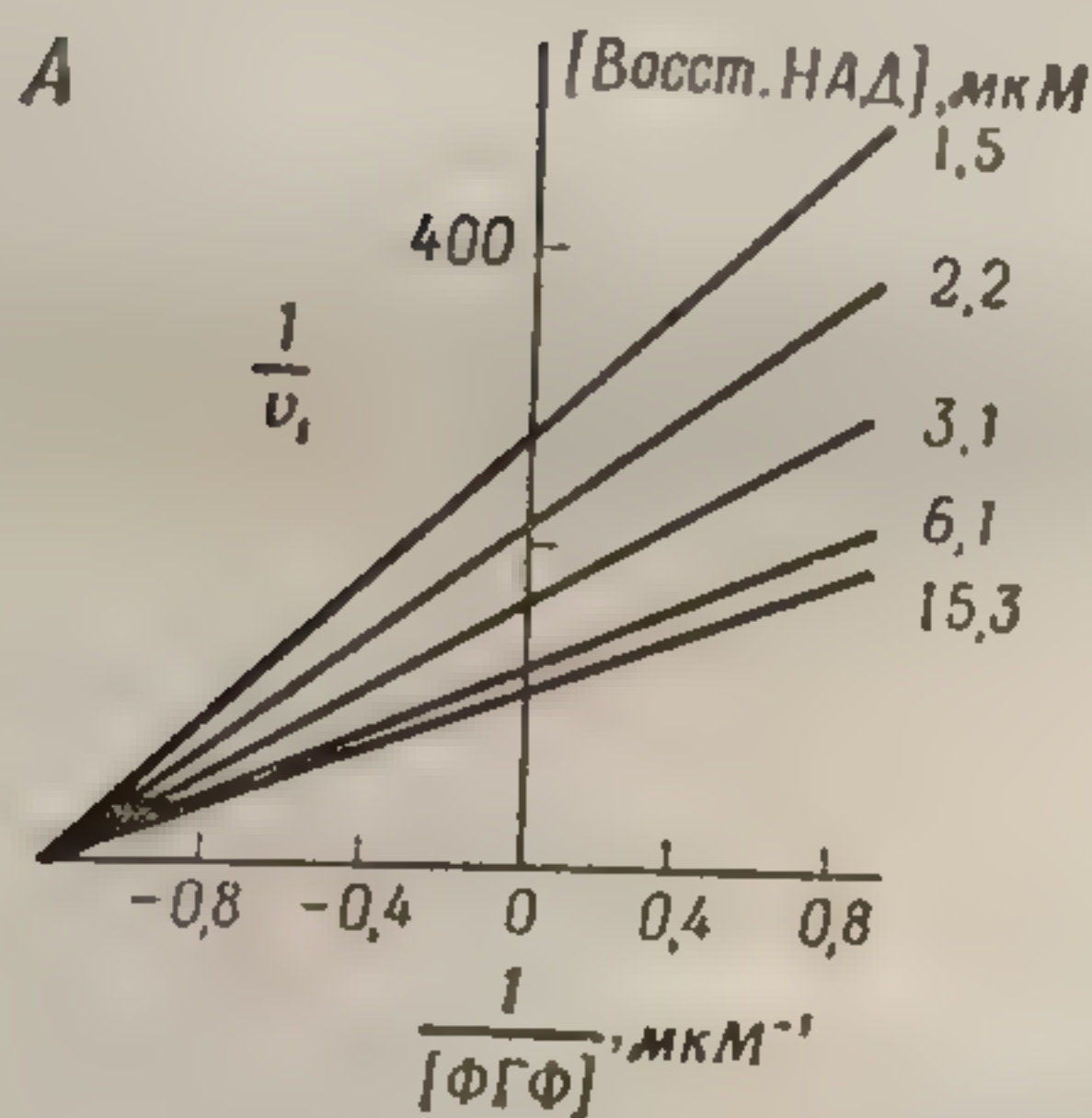
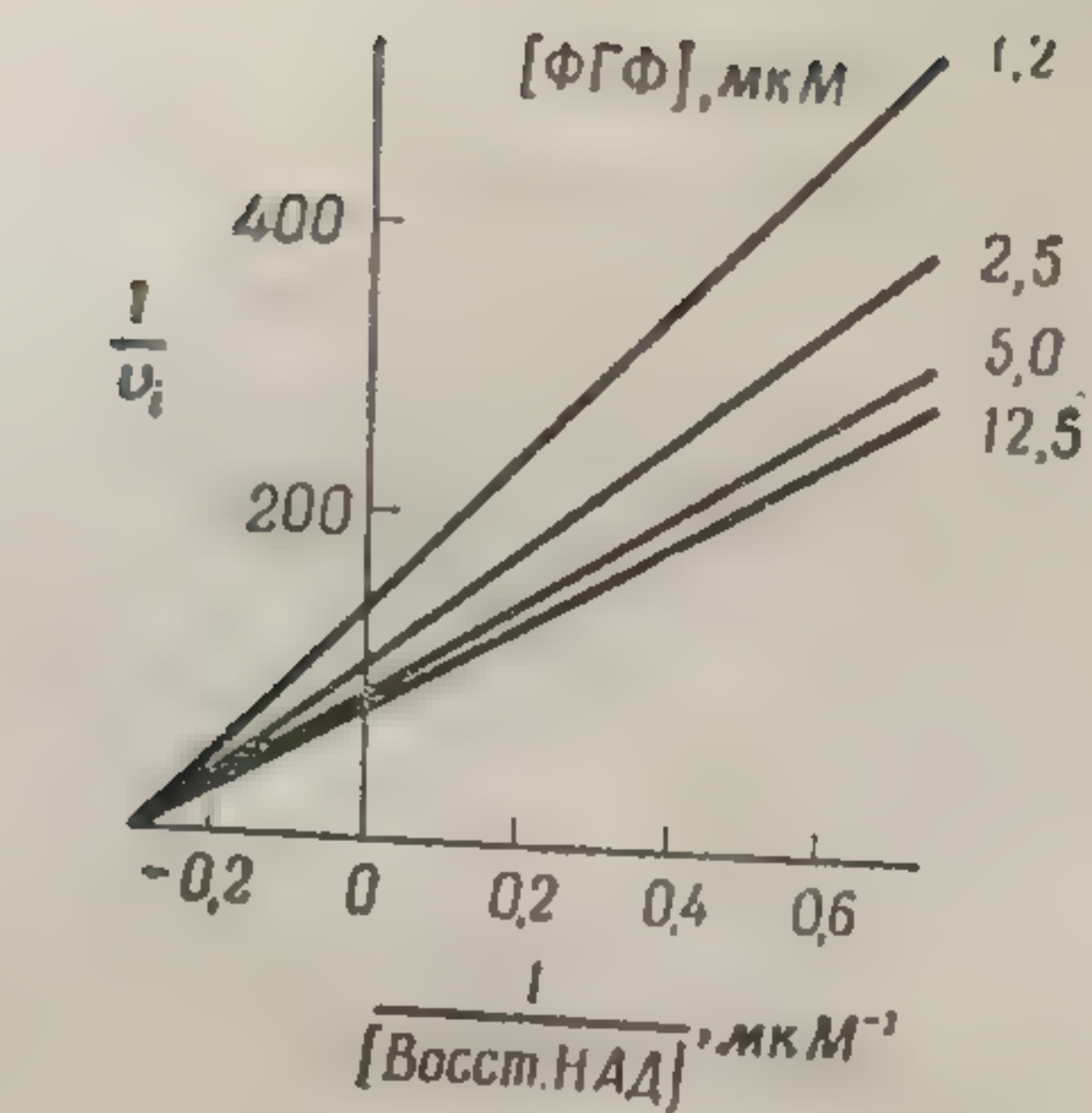
[где  $K_p$  — константа конкурентного ингибирования продуктом, соответствующая  $K_I$  в уравнении (IV. 12)], который обеспечивал наилучшее совпадение с экспериментальными данными, полученными при различных  $S_0$ . Данные были получены с помощью непрерывной записи оптической плотности при 270 мк (зависящей от концентрации субстрата) в ходе катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином гидролиза О-метилгиппурата;  $K_M = 4,0 \cdot 10^{-3}$  М,  $K_p = 5,0 \cdot 10^{-2}$  М. В. На основании серии экспериментов типа представленных на фиг. 42, Б можно построить вторичный график  $S_0/v_0$  как функции  $S_0$  (жирная прямая) и по нему определить  $K_M$  и  $k_p$ . Другой метод состоит в том, что рассчитывают интеграл

$\int_0^t [S]_t dt$  через разные промежутки времени для различных  $S_0$  и строят ряд параллельных прямых, каждая из которых соответствует определенному значению  $S_0$ . Ордината той точки такой прямой, абсцисса которой равна величине  $S_0$ , соответствующей этой прямой (черные кружки), дает  $S_0/v_0$ . В результате такого построения можно найти константу  $K_p$  по формуле

$$K_p = \frac{Y_0}{2m - (Y_0/K_M)}.$$

Светлые кружки относятся к гидролизу ацетил-L-тирозингидроксамата под действием  $\alpha$ -химотрипсина. В случае гидролиза О-метилгиппурата аналогичный расчет дает  $K_M = 4,1 \cdot 10^{-3}$  М,  $K_p = 5,0 \cdot 10^{-2}$  М.

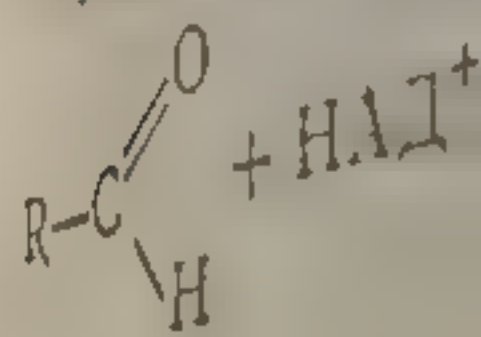
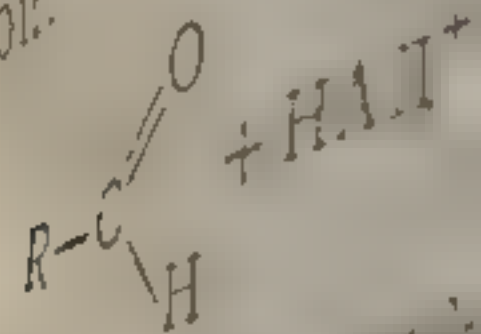




Ф и г. 43.

А — кинетика восстановления 3-фосфоглицеронилфосфата (ФГФ) посредством восстановленного НАД при pH 7,4 и 26° в 0,1 М имидазольном буфере при концентрации глицеральдегидфосфатдегидрогеназы  $4,6 \cdot 10^{-11}$  М. Константа Михаэлиса для каждого субстрата не зависит от концентрации другого субстрата. Б — графики скорости реакции как функции концентрации арсената для зоны концентраций, при которых фермент активируется арсенатом. Можно видеть, что константа Михаэлиса для арсената зависит от концентрации глицеральдегид-3-фосфата (Г-3-Ф). (C. S. Furfine and S. F. Velick, J. Biol. Chem., 240, 844, 1965.)

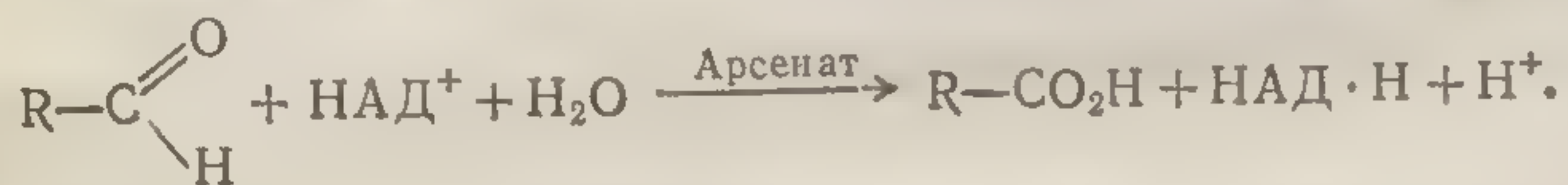
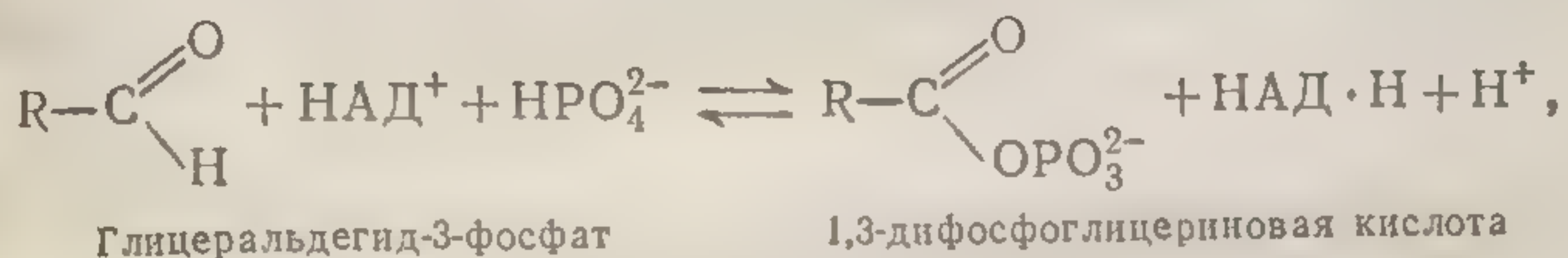
и объяснить это  
приведены гра  
ментов. участ  
рвеной фермен  
зой:



Для того что  
кинетической ко  
единения, котор  
вали с активным  
дающееся изме  
скую активност  
критериям необ  
мента. Для опре  
знать гомогеннос  
ного белка. Мож  
агрегату из нес  
или агрегату ам  
ров. Только спе  
центра фермента  
массу белка, пр  
центр. В заверш  
можно убедиться  
количествами нес  
через специфиче  
кубации. Таким  
мов белка, эквив  
фермента не буд  
ческой (1:1) ре



и выяснить его природу, если он существует. На фиг. 43 приведены графики для различных субстратов и коферментов, участвующих в обратимой реакции, катализируемой ферментом глицеральдегидфосфатдегидрогеназой:



### Определение $k_p$ и $E_0$

Для того чтобы определить абсолютное значение кинетической константы скорости ( $k_p$ ), надо найти соединения, которые бы стехиометрически взаимодействовали с активным центром фермента и оказывали поддающееся измерению воздействие на его каталитическую активность. Лучше всего удовлетворяют этим критериям необратимые ингибиторы активности фермента. Для определения концентрации  $E_0$  недостаточно знать гомогенность, а также молекулярный вес ферментного белка. Молекулярный вес может соответствовать агрегату из нескольких идентичных молекул фермента или агрегату активных и неактивных ферментных центров. Только специфическая стехиометрическая реакция центра фермента с ингибитором позволяет установить массу белка, приходящуюся на один каталитический центр. В завершении реакции фермента с ингибитором можно убедиться, преникубируя фермент с известными количествами необратимого ингибитора и измеряя скорость специфической реакции фермента с субстратом через различные промежутки времени после начала инкубации. Таким образом можно установить число граммов белка, эквивалентное 1 моль ингибитора.

Может случиться, что ингибирование активности фермента не будет являться результатом стехиометрической (1:1) реакции фермента с ингибитором. Если



приблизительный молекулярный вес фермента известен из других данных, то можно легко отличить, происходит ли реакция ингибитора с ферментом в отношении 1:1 или 2:1 (или 3:1 и т. д.). Иногда можно определить, какие именно остатки аминокислот вступают в реакцию с ингибитором (гл. V). Так, например, при взаимодействии динизопропилфторфосфата с «сернистыми» протеазами был выделен уникальный пептидный фрагмент, содержащий монофосфорилированный продукт.

Некоторые примеры необратимого ингибирования представлены на фиг. 31.

### 9. КИНЕТИКА БЫСТРОТЕКУЩИХ СТАДИЙ

Так как числа оборотов для всех реакций ферментов со специфическими субстратами очень велики ( $k_p \leq 10^2 \text{ сек}^{-1}$ ), углубленное изучение деталей промежуточных стадий катализа требует использования техники измерения высоких скоростей. До недавнего времени для наблюдения за такими процессами обычно применялись методы, основанные на технике «быстрого потока». Обычно их делят на методы «постоянного потока» и методы «остановленного потока».

#### Методы постоянного потока

Принцип этого очень простого метода схематически изображен на фиг. 44. Два раствора быстро перемешивают и смесь прокачивают насосом с заданной скоростью через трубку, в одном из участков которой производятся наблюдения (наблюдательная камера). Если скорости протекания обоих растворов известны, то, зная размеры трубки, можно точно определить время, прошедшее от момента смешивания до поступления смеси в наблюдательную камеру. Изменяя скорость потока, можно варьировать этот промежуток времени, что позволяет определять долю прореагировавшего субстрата как функцию времени, применяя тот или иной метод анализа реагентов или продуктов. Таким способом были измерены времена реакции, не превышающие 1 мсек. Недостаток метода постоянного потока состоит в том,



Фиг. 44. Схема устройства для измерения кинетики быстрых стадий

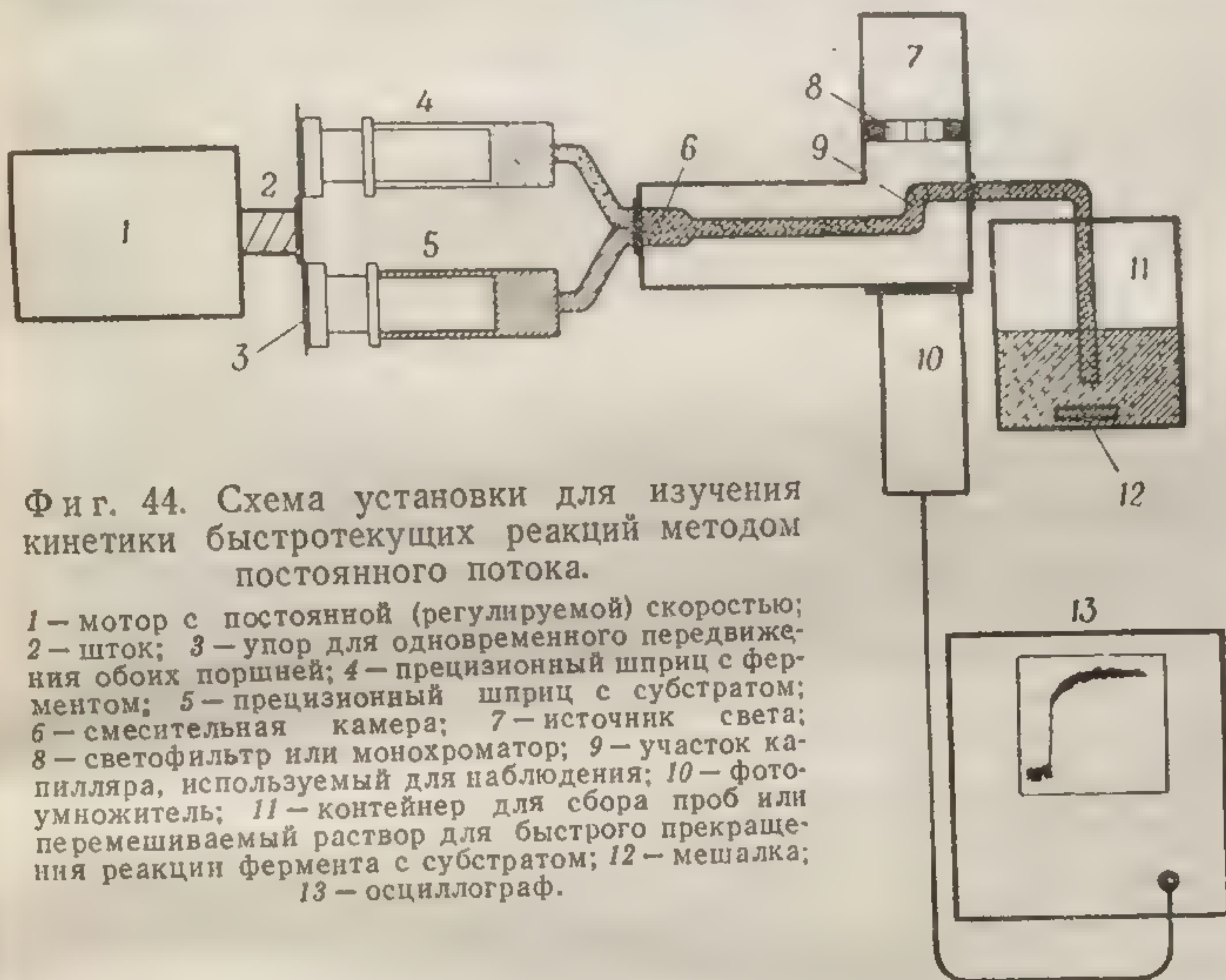
1 - мотор с постоянной скоростью; 2 - шток; 3 - упор для перемещения штока; 4 - камера для смешивания; 5 - наблюдательная камера; 6 - смешиватель; 7 - насос; 8 - световой фильтр; 9 - фотоэлемент; 10 - усилитель; 11 - контур; 12 - регистрирующее устройство; 13 - выходной канал.

которых доступность субстрата является недостатком. Можно избежать этого, изменив число наблюдений, что позволяет наблюдать реакцию в ходе одного смешивания. Метод остановки потока, описанный на фиг. 45, позволяет измерять спектральные изменения.

Метод остановки потока, описанный на фиг. 45, позволяет измерять спектральные изменения.



что для обеспечения равномерности прохождения потока по системе требуются относительно большие объемы растворов. Кроме того, в каждом опыте обычно измеряется лишь одна точка графика время — концентрация. Следовательно, этот метод применим лишь при изучении фермент-субстратных систем, оба компонента



Фиг. 44. Схема установки для изучения кинетики быстroteкущих реакций методом постоянного потока.

1 — мотор с постоянной (регулируемой) скоростью; 2 — шток; 3 — упор для одновременного передвижения обоих поршней; 4 — прецизионный шприц с ферментом; 5 — прецизионный шприц с субстратом; 6 — смесительная камера; 7 — источник света; 8 — светофильтр или монохроматор; 9 — участок капилляра, используемый для наблюдения; 10 — фотоумножитель; 11 — контейнер для сбора проб или перемешиваемый раствор для быстрого прекращения реакции фермента с субстратом; 12 — мешалка; 13 — осциллограф.

которых доступны в больших количествах. Отмеченный недостаток можно в значительной мере преодолеть, увеличив число наблюдательных камер вдоль проточной трубки, что позволяет измерять то или иное свойство реакционной смеси через различные промежутки времени в ходе одного опыта. Удобными для таких измерений параметрами являются изменения температуры и спектральные изменения.

#### Методы остановленного потока

Метод остановленного потока схематически изображен на фиг. 45. В этом методе непрерывный ход реакции



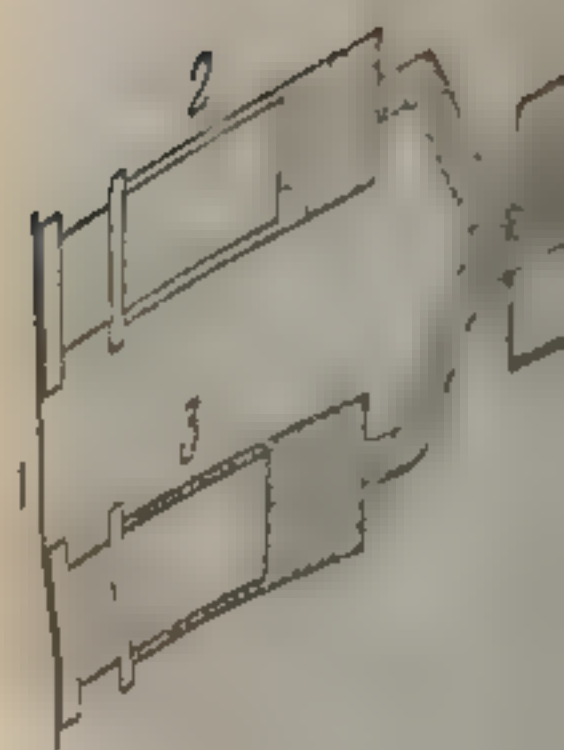
во времени записывается с помощью какого-либо малоинерционного регистрирующего устройства — чаще всего фотоумножителя, присоединенного к осциллографу. Два раствора впрыскиваются совместно через смесительную камеру в наблюдательную, как показано на схеме. Точно контролируемая скорость потока здесь несущественна; решающее значение имеет быстрота смешивания обоих растворов, чтобы отрезок времени между смешением и заполнением наблюдательной камеры был мал по сравнению со временем химической реакции. С момента остановки потока триггерный механизм записывает изменение какого-либо свойства реагента, продукта или самого активного центра фермента, как показано на фиг. 46. Как только поток остановлен и триггер сработал, можно проследить сразу весь ход реакции во времени. На смешение, заполнение наблюдательной камеры, остановку потока и спуск триггера уходит всего несколько миллисекунд. Метод остановленного потока обладает тем преимуществом, что при измерениях расходуется малое количество фермента и субстрата и не требуется столь точного контроля над скоростью потока.

Разрешающая способность обоих этих методов ограничена отрезками времени того же порядка, что и период полураспада типичных фермент-субстратных комплексов. Это затруднение можно обойти двумя способами:

1) Во многих случаях можно за счет изменения рН буфера настолько понизить число оборотов фермента (не внося никаких существенных изменений в детали каталитического механизма), что это позволяет наблюдать за ходом специфической реакции фермента с субстратом.

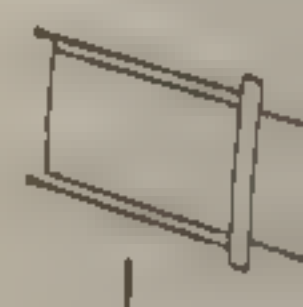
2) Можно использовать «псевдосубстраты» с большим временем превращения, чем у субстрата, специфического для данного фермента. Последний прием (хотя он часто и оказывается удобным) требует проверки того, что механизмы реакции фермента с псевдосубстратом и со специфическим субстратом в основном совпадают.

Если течение реакции фермента с субстратом удастся проследить любым из двух описанных выше методов, то экспериментальные данные могут быть проанализи-



Фиг. 45. Схема устройства для исследования реакции

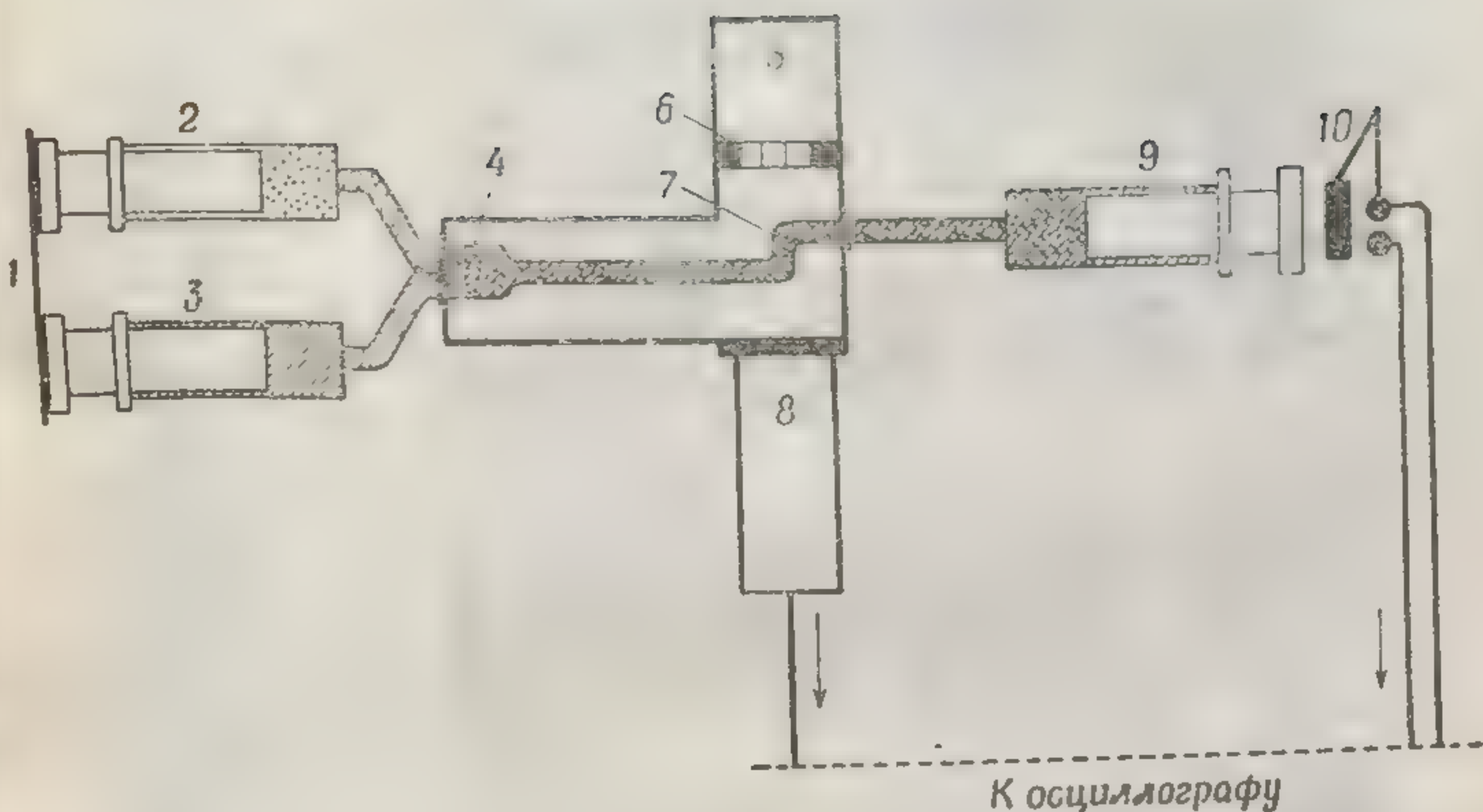
1 — пластина для ввода фермента, 2 — предизмерительная камера, 3 — камера для наблюдения, 5 — источник света, 6 — датчик, используемый для измерения



Фиг. 46. Приспособление для исследования стадий процесса

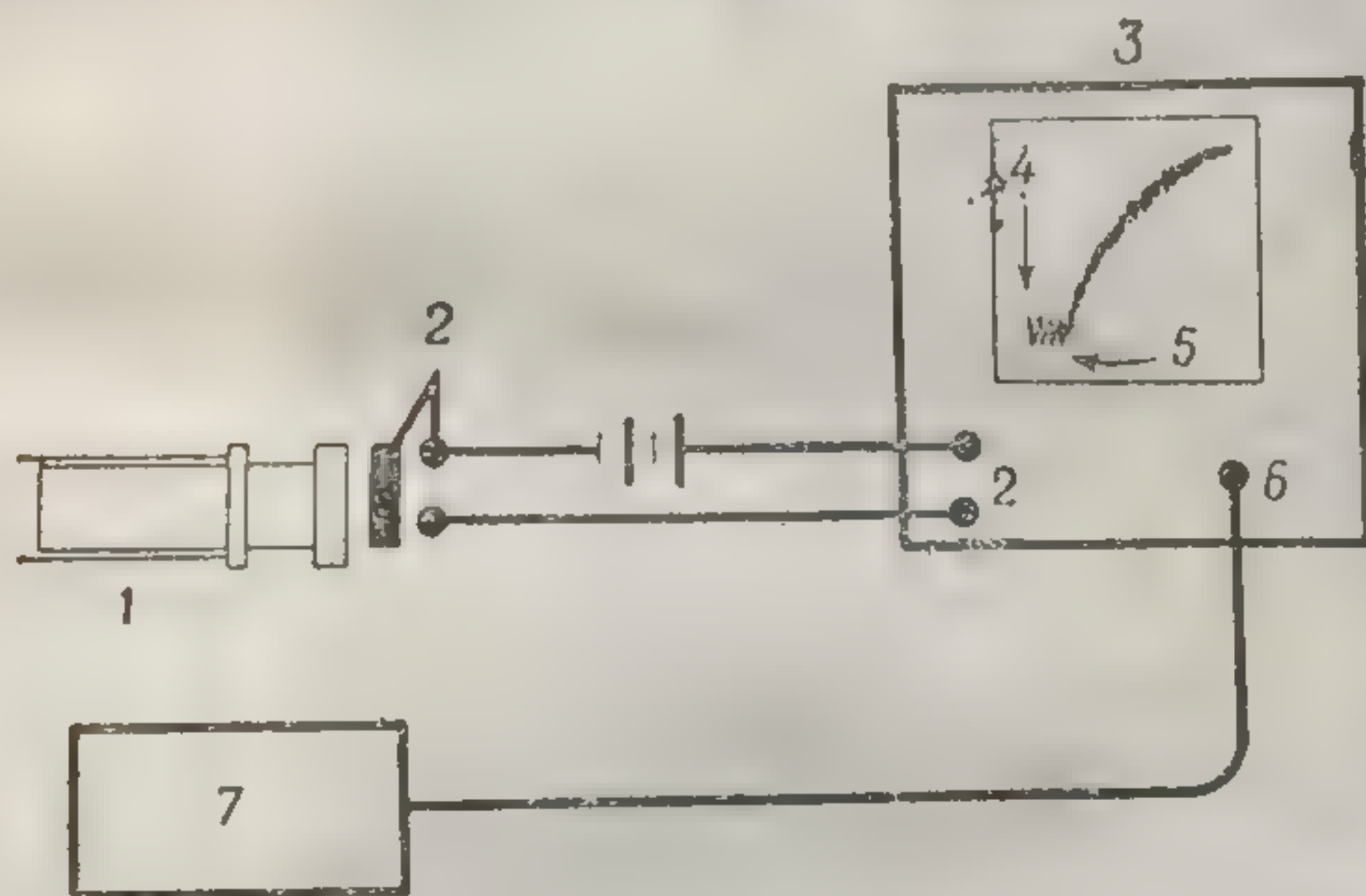
1 — шприц; 2 — триггер; 6 — сигнал





Фиг. 45. Схема установки для изучения кинетики быстротекущих реакций методом остановленного потока.

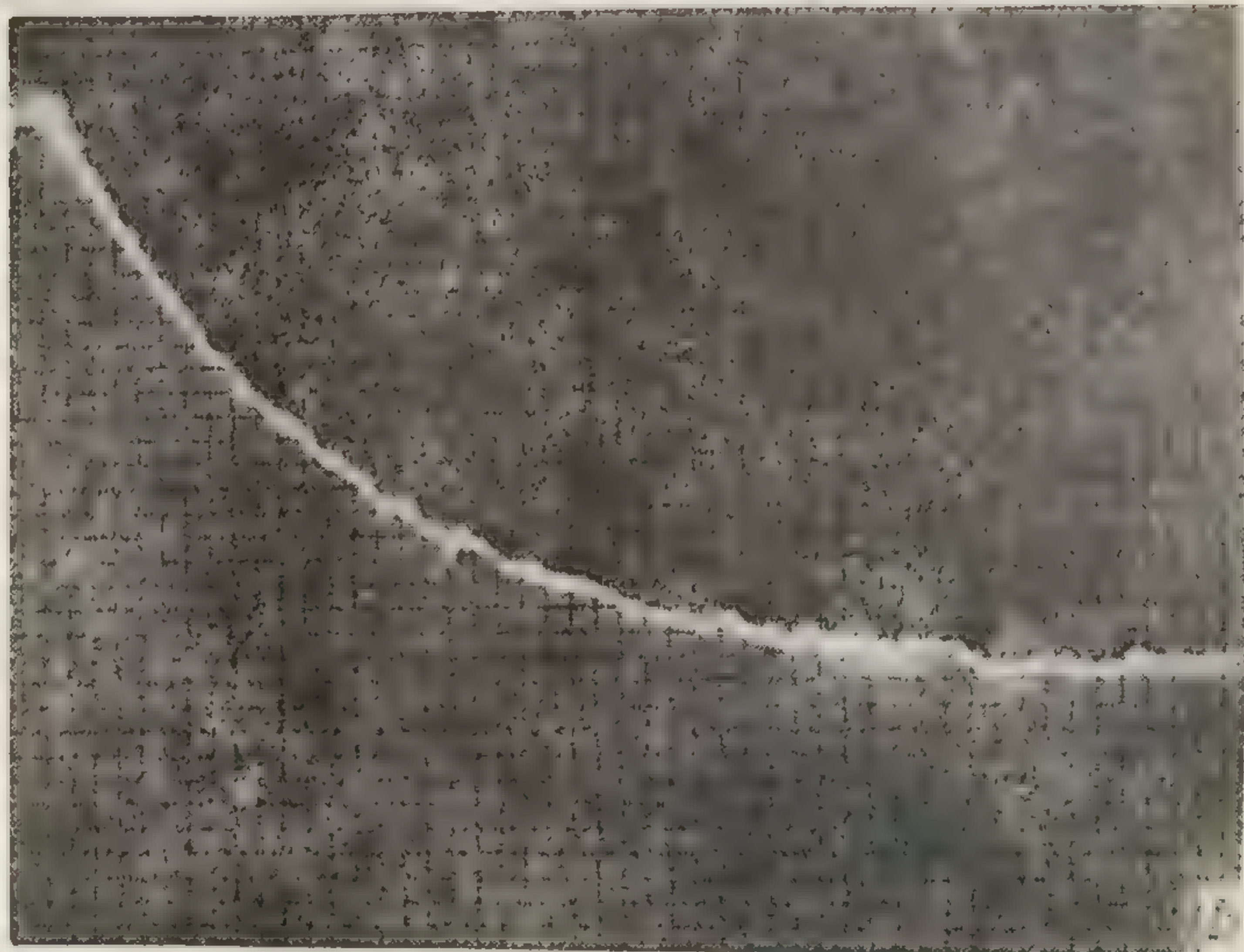
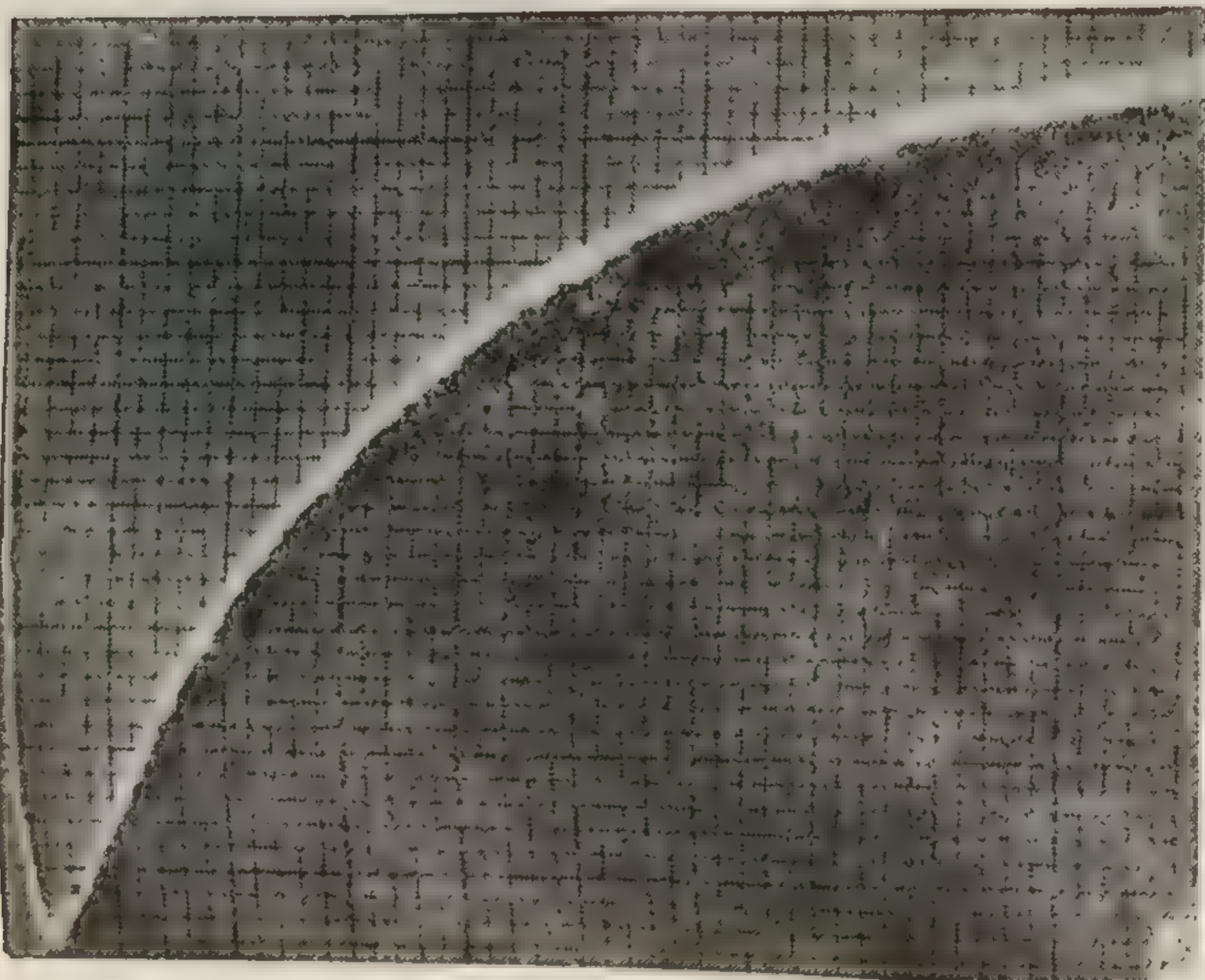
1 — пластина для вталкивания поршней вручную; 2 — прецизионный шприц для фермента; 3 — прецизионный шприц для субстрата; 4 — смешительная камера; 5 — источник света; 6 — светофильтр или монохроматор; 7 — участок капилляра, используемый для наблюдения; 8 — фотоумножитель; 9 — останавливающий шприц; 10 — триггер.



Фиг. 46. Приспособление для записи кинетики быстротекущих стадий процесса после остановки потока (см. фиг. 45).

1 — шприц; 2 — триггер; 3 — осциллоскоп; 4 — спуск триггера; 5 — остановка потока; 6 — сигнал из проточной камеры; 7 — фотоумножитель.





Ф и г. 47. Осциллограммы, иллюстрирующие кинетику быстротекущих стадий процесса, полученные методом остановленного потока.

Изучалась реакция О-метилового эфира N-[ $\beta$ -(2-фурил)-акрилоил]-L-триптофана с присутствующим в избытке  $\alpha$ -химотрипсином (рН 5,30). Изменения поглощения при 330 мкм хромофорной (фурилакриламидной) группы субстрата регистрировались при двух скоростях сканирования. А. Большое деление соответствует 500 мсек. Б. Большое деление соответствует 20 мсек. Время между смещением и началом наблюдений составляет несколько миллисекунд. После смещения разрешение во времени — порядка 0,1 мсек.

Константа  
ное отноше  
ляются фу  
мер темпе  
изменение  
таблицей

Равновесие  
этой сист

Для т  
В основе  
ую систе

10. РЕЛАКС

с субстрата  
порядка 10  
разработан  
тоды дают  
ских реакц

Совсем  
дать любой  
информации  
приведены

на данные  
фермент  
изучения к  
стандартн  
реакции. П

с Г

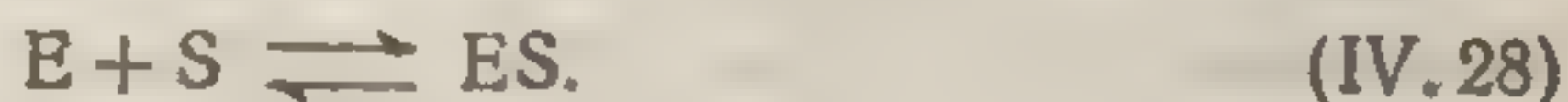


рованы с помощью обычных приемов расчета скорости реакций. При этом удается избежать сложных алгебраических выражений, возникающих при рассмотрении стационарных состояний. Таким образом, результаты изучения кинетики быстротекущих стадий дают более прямые указания относительно молекулярного механизма ферментативной реакции. Некоторые экспериментальные данные, полученные методом остановленного потока, приведены на фиг. 47. Однако для получения детальной информации о механизме реакции нередко требуется значительно лучшее разрешение во времени, чем может дать любой из этих методов.

Совсем недавно при изучении реакций ферментов с субстратами удалось достичь разрешения во времени порядка 10 мксек, используя «релаксационные методы», разработанные Эйгеном с сотрудниками. Эти новые методы дают возможность описать механизм каталитических реакций еще более детально.

#### 10. РЕЛАКСАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ И ОБРАТИМЫЕ СИСТЕМЫ

Для того чтобы лучше понять принципы, лежащие в основе релаксационных методов, рассмотрим обратимую систему



Равновесные концентрации реагентов и продуктов в этой системе описываются уравнением

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{\{E_0 - [ES]\}\{S_0 - [ES]\}}{[ES]} = K_S = \frac{k_{-s}}{k_s}. \quad (IV. 29)$$

Константа равновесия ( $K_S$ ) и, следовательно, равновесное отношение концентраций продуктов и реагентов являются функцией определенных условий среды, например температуры. Изменение константы равновесия с изменением абсолютной температуры определяется *энтальпией* реакции  $\Delta H$ , согласно уравнению

$$\frac{d \ln K_S}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}. \quad (IV. 30)$$



Рассмотрим теперь, что происходит при внезапном изменении условий среды (в нашем случае — температуры). Кинетическая энергия молекул растворителя при этом изменяется, и через короткий промежуток времени снова устанавливается равновесие между растворителем и окружающей средой, но теперь уже при новой температуре. Изменяется также константа равновесия и, следовательно, отношение концентраций продуктов и реагентов. Однако, для того чтобы осуществилось это неизбежное перераспределение продуктов и реагентов, скорости двух химических процессов (с кинетическими константами скоростей  $k_s$  и  $k_{-s}$ ) обязательно должны измениться так, чтобы установилось новое положение равновесия. Если эти скорости малы по сравнению со скоростью термической перестройки равновесия растворителя и если техника эксперимента позволяет изменить температуру системы достаточно быстро (по сравнению со скоростью сдвига химического равновесия), то в принципе имеется возможность измерить длительность лаг-периода в перераспределении продуктов и реагентов.

#### Одноступенчатые обратимые системы (фиг. 48)

Результирующая скорость образования комплекса ES описывается в этом случае уравнением

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_s [E] [S] - k_{-s} [ES], \quad (IV. 31)$$

Предположим, что растворитель можно нагреть от начальной температуры  $T_1$  до некоторой более высокой температуры  $T_2$  так быстро («температурный скачок»), что скорость, с которой достигается термическое равновесие, значительно превысит скорости прямой и обратной реакций. Обозначим разность между равновесными концентрациями ES при этих двух температурах через  $X_{\text{равн}}$ , т. е.

$$X_{\text{равн}} = [ES]_{\text{равн}}^{T_2} - [ES]_{\text{равн}}^{T_1}. \quad (IV. 32)$$

В условиях нашего эксперимента

$$[ES]_{t=0} = [ES]_{\text{равн}}^{T_1} \equiv [ES]_0.$$

Кинетика  
где  $t=0$  — момент  
концентрационн  
момент было сгр

Когда химическая  
 $T_2$  мы имеем

Храв

Тогда и только т  
при переходе от  $T_1$   
сия  $K_s$  при  $T_1$  и  $T_2$



Фиг. 48. Кривая, и  
некоторое физическо  
ши, после мгновенно

членом  $X_{\text{равн}}$  в з  
пренебречь. При  
уравнением

Храв



где  $t = 0$  — момент нагревания от  $T_1$  до  $T_2$ . Определим концентрационную переменную  $X_t$  так, чтобы в любой момент было справедливо равенство

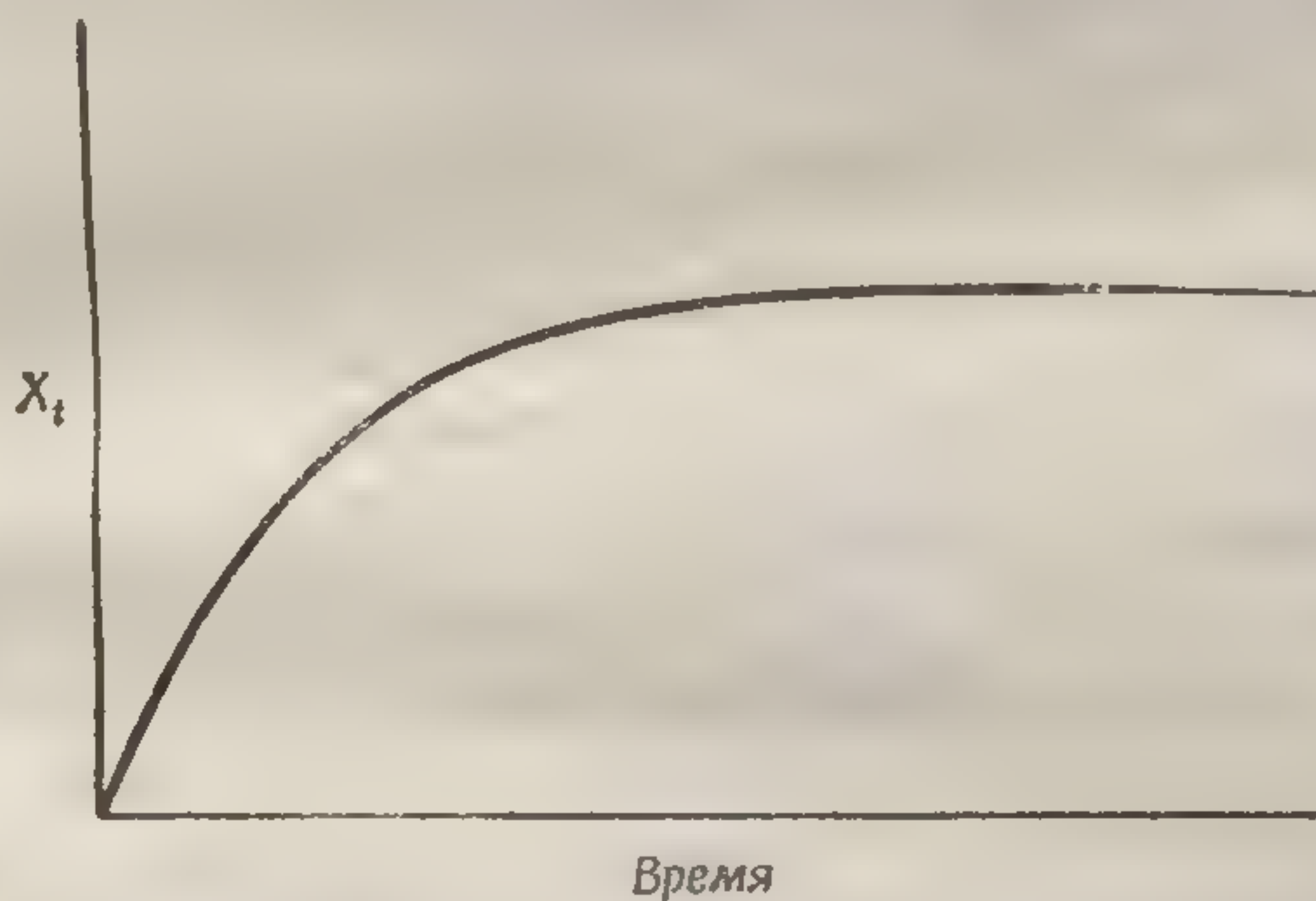
$$X_t = [ES]_t^{T_2} - [ES]_0.$$

Когда химическая система достигает равновесия при  $T_2$ , мы имеем

$$K_S^{T_2} = \frac{(E_0 - X_{\text{равн}})(S_0 - X_{\text{равн}})}{[ES]_0 + X_{\text{равн}}}, \quad (\text{IV. 33})$$

$$X_{\text{равн}} = \frac{E_0 S_0 - K_S^{T_2} [ES]_0}{K_S^{T_2} + E_0 + S_0 - X_{\text{равн}}}.$$

Тогда и только тогда, когда термическая перестройка при переходе от  $T_1$  к  $T_2$  мала (т. е. константы равновесия  $K_S$  при  $T_1$  и при  $T_2$  различаются не очень сильно),



Фиг. 48. Кривая, иллюстрирующая, как изменяется во времени некоторое физическое свойство, линейно зависящее от концентрации, после мгновенного изменения температуры в одноступенчатой системе.

членом  $X_{\text{равн}}$  в знаменателе уравнений (IV. 33) можно пренебречь. При этом условии  $X_{\text{равн}}$  будет выражаться уравнением

$$X_{\text{равн}} \approx \frac{E_0 S_0 - K_S^{T_2} [ES]_0}{K_S^{T_2} + E_0 + S_0}. \quad (\text{IV. 34})$$



Возвращаясь к уравнению (IV.31), для указанных условий мы получаем

$$\begin{aligned} \frac{d[ES]}{dt} = \frac{dX}{dt} &= k_S (E_0 - X_t) (S_0 - X_t) - k_{-S} ([ES]_0 + X_t), \\ \frac{1}{k_S} \left( \frac{dX}{dt} \right) &= \{E_0 S_0 - K_S^{T_2} [ES]_0\} - X_t (S_0 + E_0 + K_S^{T_2}). \end{aligned} \quad (IV.35)$$

Подстановка уравнения (IV.34) в уравнение (IV.35) дает линеаризованное уравнение скорости реакции

$$\frac{1}{k_S} \frac{dX}{dt} = (X_{\text{равн}} - X_t) (K_S^{T_2} + E_0 + S_0)$$

или

$$\frac{dX}{X_{\text{равн}} - X_t} = \{k_S (S_0 + E_0) + k_{-S}\} dt. \quad (IV.36)$$

Интегрируя, получаем решение уравнения (IV.36) в виде

$$X_t = X_{\text{равн}} [1 - \exp\{-k_{-S} - k_S (S_0 + E_0)\} t]. \quad (IV.37)$$

Это уравнение может быть записано в виде

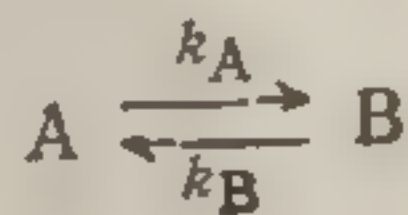
$$X_t = X_{\text{равн}} \{1 - \exp(-t/\tau)\}, \quad (IV.38)$$

или в дифференциальной форме

$$\frac{dX}{dt} + \frac{1}{\tau} X_t = \frac{1}{\tau} X_{\text{равн}}. \quad (IV.39)$$

Отметим, что  $\tau$  имеет размерность времени; эта величина называется *временем релаксации*. Вследствие линейной формы уравнения (IV.38) параметр  $\tau$  можно определить по результатам измерений любого свойства, непосредственно связанного с концентрационной переменной  $X_t$  (например, изменения оптической плотности  $\Delta = KX_t$ ), как показано на фиг. 48.

Читатель легко может проверить, что для мономолекулярного процесса

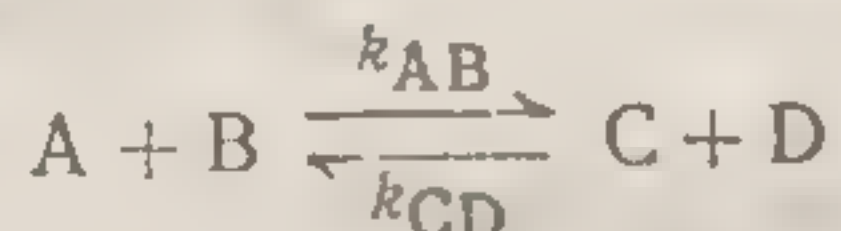




уравнение (IV.38) справедливо и что

$$\tau = \frac{1}{k_A + k_B}.$$

Аналогично для обратимой бимолекулярной реакции (протекающей с двойным вытеснением)



получаем для  $\tau$  выражение

$$\tau = \frac{1}{k_{AB}(A_0 + B_0) + k_{CD}(C_0 + D_0)}. \quad (IV.40)$$

Отметим еще два свойства величины  $\tau$ :

1. Для любого обратимого процесса (например,  $E + S \rightleftharpoons ES$ ) время релаксации зависит от начальных концентраций участников бимолекулярной стадии ( $E + S \rightarrow$ ), но не зависит от концентрации участника мономолекулярной стадии ( $ES$ ).

2. Уравнения (IV.38) и (IV.39) служат математическим описанием реакции первого порядка. Следовательно,  $1/\tau$  можно вычислить так же, как кинетическую константу скорости реакции первого порядка (например, по наклону графика зависимости  $\ln(X_{\text{равн}}/X)$  от времени). Отметим, однако, что для обратимой системы эта кажущаяся кинетическая константа скорости определяется равенством

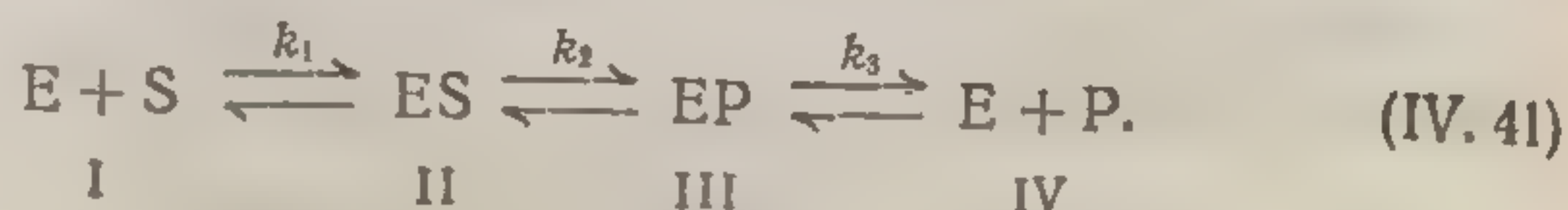
$$k' = \frac{1}{\tau} = k_s(S_0 + E_0) + k_{-s},$$

т. е. она равна сумме двух кинетических констант скоростей, и, следовательно, в пределе скорость приближения к равновесию определяется скоростью более быстрого процесса, а не более медленного. Для необратимых реакций часто принято относить экспериментально определяемую кинетическую константу скорости к той стадии, которая лимитирует скорость всего процесса в целом. В отношении обратимой последовательности реакций это, конечно, неверно.

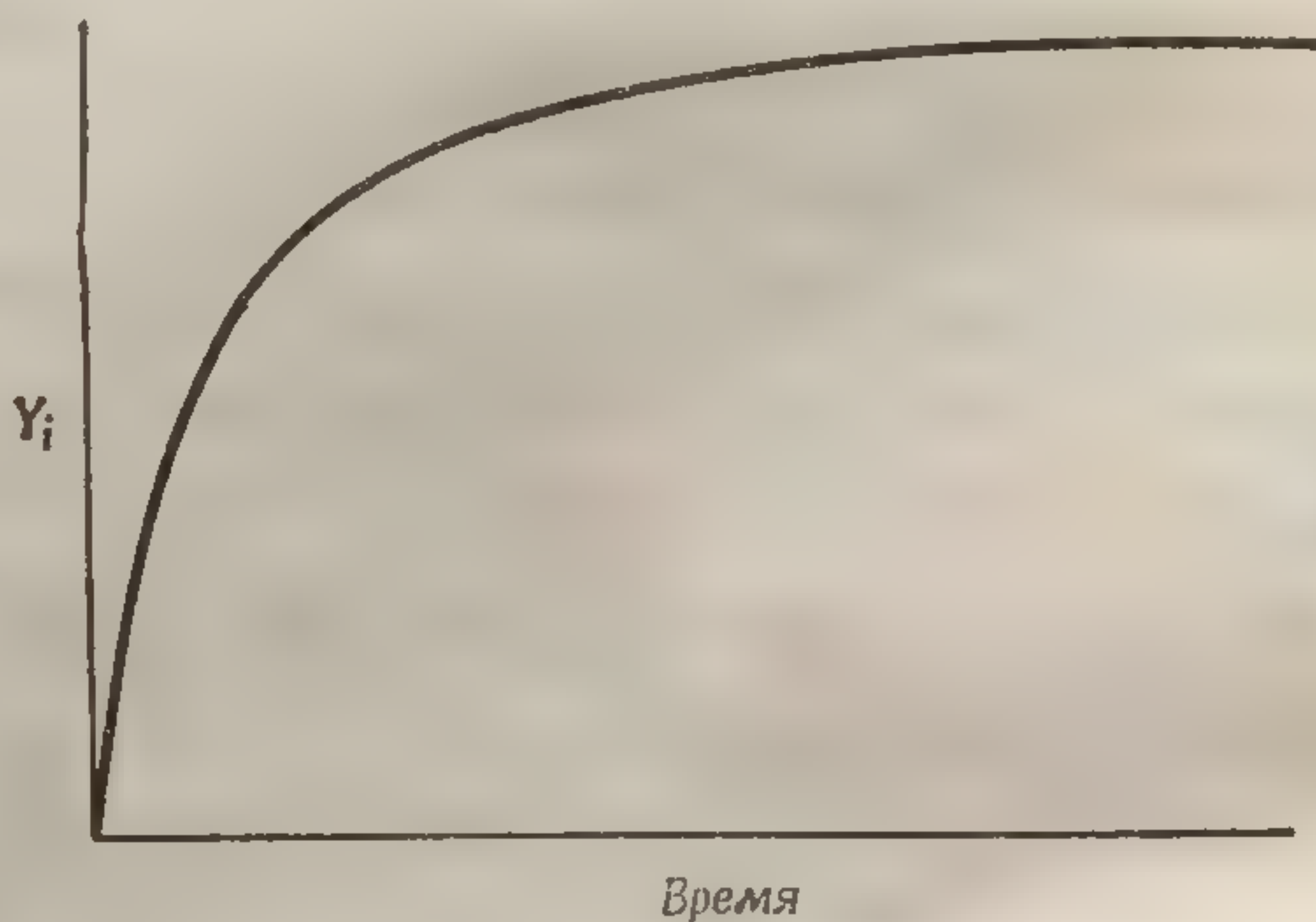


### Многоступенчатые обратимые системы (фиг. 49)

Ферментативные реакции всегда включают ряд последовательных обратимых стадий; примером может служить процесс



Для последовательности реакций, в которой промежуточные продукты (в нашем случае ES и EP) образуются в стехиометрически существенных концентрациях, нельзя



Фиг. 49. Кривая, иллюстрирующая, как изменяется во времени некоторое физическое свойство, линейно зависящее от концентрации, после мгновенного изменения температуры в трехступенчатой системе.

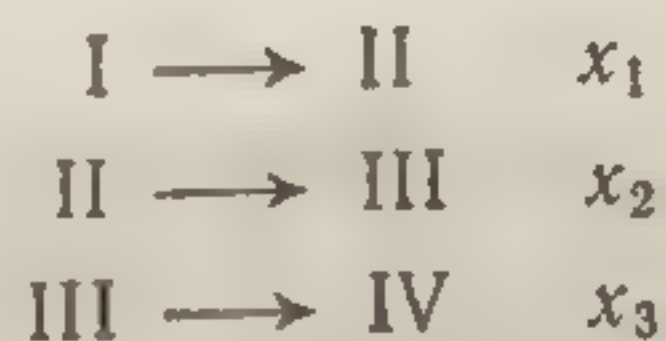
определить измеряемую концентрационную переменную с помощью такой прямолинейной процедуры, как в предыдущем случае [уравнение (IV. 32)], так как вещества, участвующие в одной стадии (например,  $\text{E} + \text{P} \rightleftharpoons \text{EP}$ ), влияют на концентрации участников всех других стадий. Многоступенчатые последовательности реакций могут быть и уже были проанализированы с помощью метода температурного скачка, обсуждавшегося ранее для одноступенчатых обратимых систем. Новое при анализе бо-

Для удобства об-  
(глубиной превр-  
реакции в произ-  
(глубиной превр-  
жении равнове-



лее сложных систем состоит по существу лишь в том, как определяются характеризующие реакцию переменные, которые все или в большинстве своем зависят от глубины превращения на *каждой* стадии. Эти переменные (определение их будет дано ниже) представляют собой сложные концентрационные переменные, относящиеся к определенной последовательности химических трансформаций. Аналогично, как мы увидим, определенной последовательности реакций соответствует набор различных времен релаксации ( $\tau_i$ ), каждое из которых может быть связано с совокупностью кинетических констант, характеризующих различные стадии этой последовательности. На основании полученных экспериментальных данных можно рассчитать все эти индивидуальные кинетические константы при условии, что скорости индивидуальных реакций лежат в пределах разрешающей способности применяемого экспериментального метода.

Если равновесные концентрации молекул всех видов меняются лишь незначительно при небольших изменениях внешних условий (т. е. если каждая индивидуальная константа равновесия лишь слегка меняется с изменением температуры), то приближение, ранее использованное в уравнении (IV.34) ( $E_0, S_0 > X_{\text{равн}}$ ), вновь будет правомерным. Для реакции (IV.41) можно определить три (и только три) независимые концентрационные переменные  $x_1, x_2$  и  $x_3$ . Эти переменные описывают зависящую от времени глубину превращения на отдельных стадиях реакции, обусловленную внезапным изменением температуры:



Для удобства обозначим через  $\Delta x_k$  разницу между  $x_k$  (глубиной превращения для одной какой-либо стадии реакции в произвольный момент времени) и  $(x_k)_{\text{равн}}$  (глубиной превращения для этой же стадии по достижении равновесия при  $T_2$ )

$$\Delta x_k = (x_k)_{\text{равн}} - x_k.$$



Используя допущение (IV. 34), мы можем написать для процесса  $I \rightleftharpoons II$  [уравнение (IV. 41)] следующие два соотношения:

$$E_0 S_0 - K_1 [ES]_0 = K_1 \{(x_1)_{\text{равн}} - (x_2)_{\text{равн}}\} + \\ + E_0 (x_1)_{\text{равн}} + S_0 \{(x_1)_{\text{равн}} - (x_3)_{\text{равн}}\}$$

■

$$\frac{1}{k_1} \frac{dx_1}{dt} = E_0 S_0 - K_1 [ES]_0 - K_1 (x_1 - x_2) - E_0 x_1 - S_0 (x_1 - x_3). \quad (\text{IV. 42})$$

Из этих двух уравнений мы получаем выражение для  $dx_1/dt$  как функции всех трех концентрационных переменных

$$\frac{dx_2}{dt} = k_1 \{S_0 (\Delta x_1 - \Delta x_3) + E_0 \Delta x_1\} - k_{-1} (\Delta x_1 - \Delta x_2). \quad (\text{IV. 43})$$

С помощью аналогичных рассуждений можно получить выражения для  $\frac{dx_2}{dt}$  и  $\frac{dx_3}{dt}$

$$\frac{dx_2}{dt} = k_2 (\Delta x_2 - \Delta x_1) + k_{-2} (\Delta x_2 - \Delta x_3), \\ \frac{dx_3}{dt} = k_3 (\Delta x_3 - \Delta x_2) + k_{-3} \{E_0 \Delta x_3 + P_0 (\Delta x_3 - \Delta x_1)\}. \quad (\text{IV. 44})$$

Отметим, что *каждое* уравнение скорости содержит линейную комбинацию трех условно выбранных концентрационных переменных  $x_1$ ,  $x_2$  и  $x_3$ :

$$\frac{d(x_i)}{dt} = a_{i1} \Delta x_1 + a_{i2} \Delta x_2 + a_{i3} \Delta x_3$$

или в общем виде

$$\frac{d(x_i)}{dt} + \sum a_{ik} x_k = \sum a_{ik} (x_k)_{\text{равн}} \quad (\text{IV. 45})$$

Эти наборы *линейных* уравнений всегда могут быть преобразованы в равное число *линейных* уравнений с новым набором концентрационных переменных  $Y_i$  (в нашем

Каждый случай их три, при времени может быть

Каждое  $Y_i$  представлено с  $x_1, x_2$  и  $x_3$  идентично по форме. Эти новые концентрации являются от времени в отдельных образцах  $1/\tau_i$  -- величина связана с комбинацией характеризующих экспериментальные концентрации. Всегда выполняется условие (IV. 46) позволяющее для изменений концентрационных свойств) с изданием для отдельных то для системы с тем, (IV. 41)] можно релаксации ( $\tau_1, \tau_2$  и времена релаксации даваемые изменения  $Y_i$  нацией уравнений скорости и именно

$$Y_{\text{общ}} = A \exp(-t/\tau)$$

и изменение  $Y_{\text{общ}}$  не связано с законом сциальному закону сциальному (число раз тем самым определено число обратимых результатов этого минимума

1 Линейное преобразование уравнений типа (IV. 45) матричной алгебре, а в этом методе Эйгена и главы).



случае их три), причем для каждого  $Y_i$  зависимость от времени может быть выражена в виде<sup>1</sup>

$$\frac{d(Y_i)}{dt} + b_{ii}Y_i = b_{ii}(Y_i)_{\text{равн.}} \quad (\text{IV. 46})$$

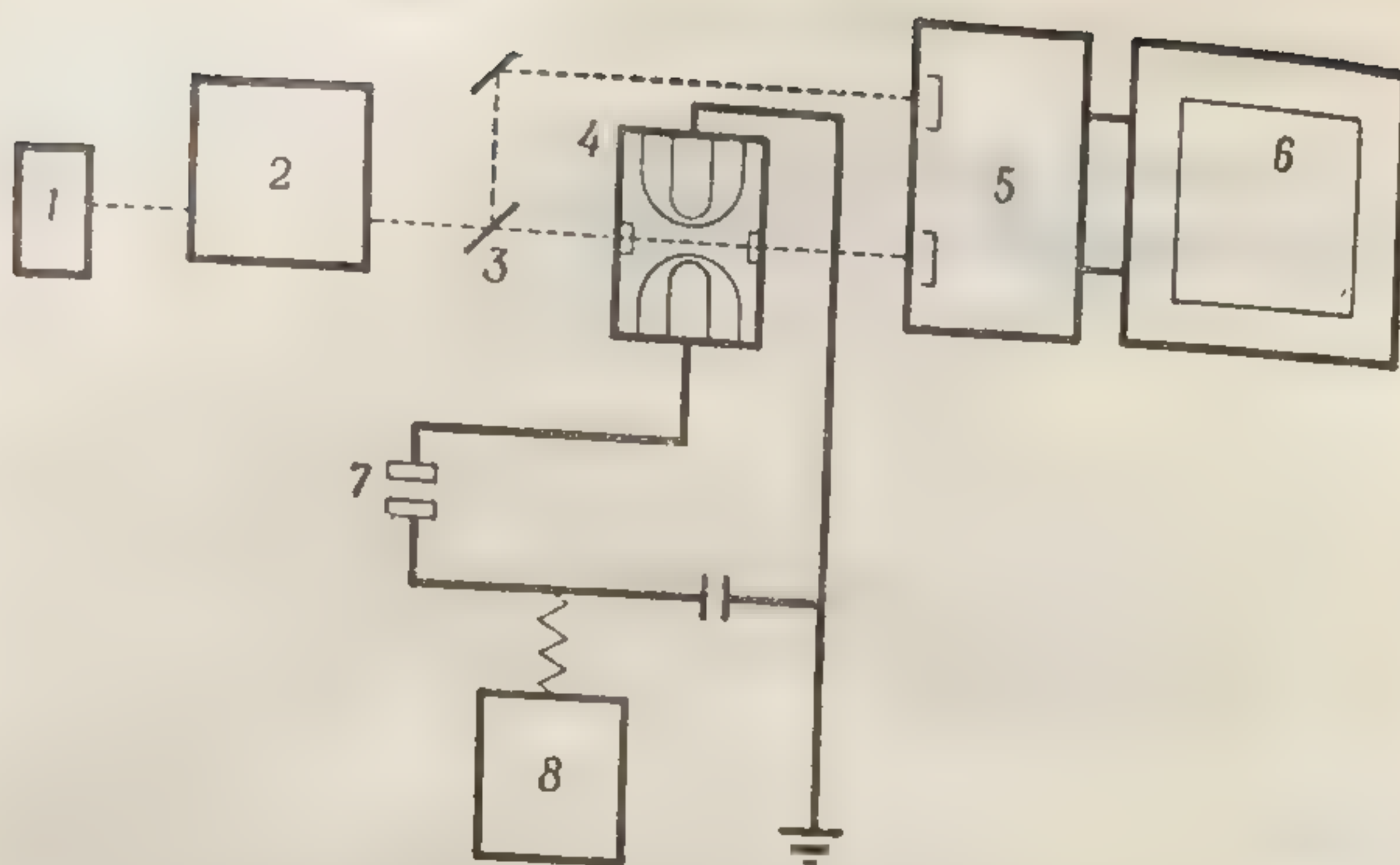
Каждое  $Y_i$  представляет собой линейную комбинацию членов с  $x_1$ ,  $x_2$  и  $x_3$ . Отметим, что уравнение (IV. 46) идентично по форме уравнению (IV. 39) при  $b_{ii} = 1/\tau_i$ . Эти новые концентрационные переменные относятся к зависящим от времени изменениям в системе в целом, а не в отдельных обратимых процессах. Подобным же образом  $1/\tau_i$  — величина, обратная времени релаксации, связана с комбинациями кинетических констант скорости, характеризующих все стадии реакции. Если экспериментальные концентрационные условия таковы, что всегда выполняется соотношение  $(c_i)_0 > x_k$ , то уравнение (IV. 46) позволяет установить корреляцию наблюдаемых изменений концентраций (или изменений физических свойств) с изменениями  $Y_i$ . Если времена релаксации для отдельных стадий существенно различаются, то для системы с тремя обратимыми стадиями [например, (IV. 41)] можно наблюдать три различных времени релаксации ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$  и  $\tau_3$ ). Если же некоторые или все времена релаксации сравнимы по величине, то наблюдаемые изменения  $Y_{\text{общ}}$  можно описать линейной комбинацией уравнений скоростей для индивидуальных стадий, а именно

$$Y_{\text{общ}} = A \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + B \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + C \exp\left(-\frac{t}{\tau_3}\right),$$

и изменение  $Y_{\text{общ}}$  не будет следовать единому экспоненциальному закону скорости. Если установлено (минимальное) число различных времен релаксации ( $\tau_i$ ), то тем самым определено соответствующее (минимальное) число обратимых стадий реакции. Из определенного в результате этого минимального пути реакции [например,

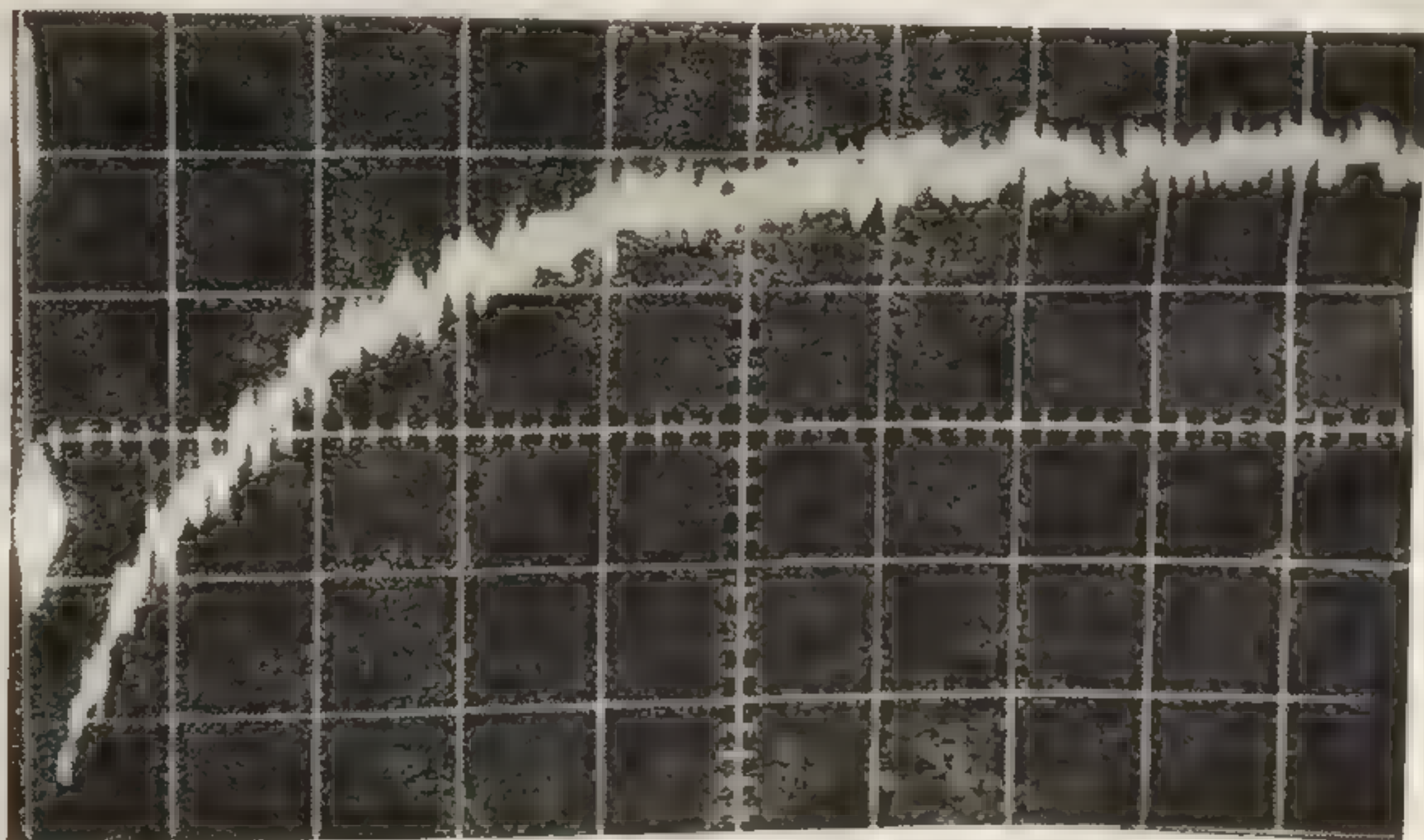
<sup>1</sup> Линейное преобразование уравнений типа (IV. 43) и (IV. 44) в уравнения типа (IV. 46) описывается в стандартных учебниках по матричной алгебре, а также в отличной статье по релаксационным методам Эйгена и де Мейера (см. список литературы в конце главы).





Ф и г. 50. Схема установки для изучения кинетики методом температурного скачка.

1 — источник света; 2 — монохроматор; 3 — оптическая система, расщепляющая световой пучок; 4 — камера наблюдения; 5 — фотоумножители, катодный повторитель; 6 — осциллограф; 7 — искровой промежуток; 8 — источник высокого напряжения.



Ф и г. 51. Изменение оптической плотности во времени вслед за температурным скачком в системе с единственным временем релаксации (G. G. Hammes and M. L. Morrell, J. Am. Chem. Soc., 86, 1497, 1964).

$Ni(II)$ -пирофосфатная система;  $\Sigma Ni^{2+} = 9,62 \cdot 10^{-4} M$ ,  $\tau = 900$  мксек. Масштаб по оси абсцисс — одно большое деление соответствует 500 мксек; по оси ординат отложена оптическая плотность в условных единицах (уменьшается снизу вверх).

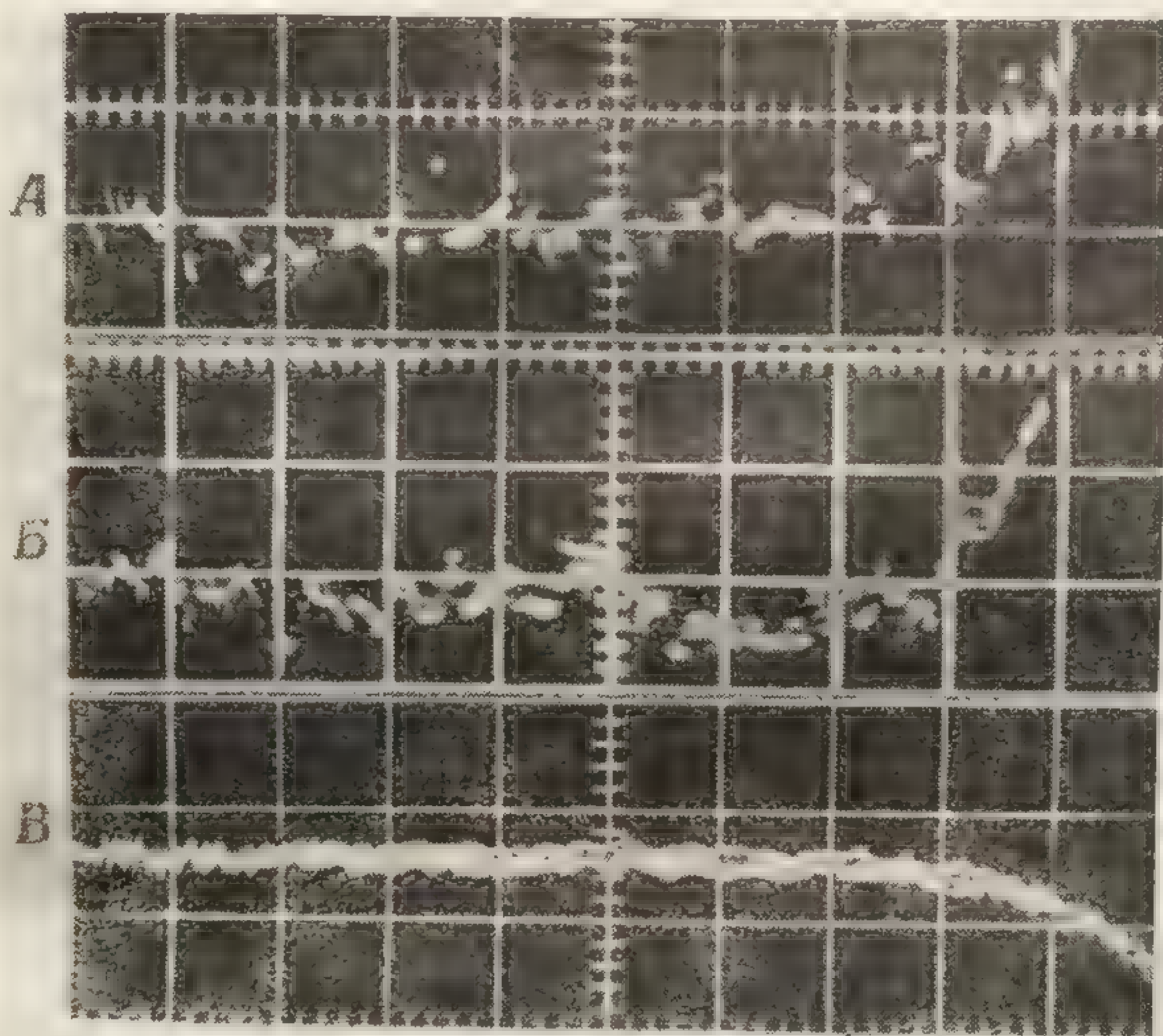
Ф и г. 52. Осциллограммы температурным скачком при pH 6,7 (все

А. Изомеризация фермента с субстратом. Показанное деление шкалы — большое деление абсцисс — большое деление ординат. Наблюдающееся явление вызвано началом реакции, показанной в масштабе  $S_0 = 1,10 \cdot 10^{-3} M$ . Масштаб по оси абсцисс:  $\tau_1 = 100$  мксек;  $\tau_2 = 113$  мксек. Показана оптическая плотность.

что скорости реакции, различные начальные концентрации (р



(IV.41)] соотношение между  $\tau_i$  и индивидуальными константами скорости однозначно определяется на основании обязательного соотношения между  $x_R$  и  $Y_i$  [уравнения (IV.45) и (IV.46)]. Вновь следует подчеркнуть,



Фиг. 52. Осциллограмма эффектов, возникающих вслед за температурным скачком в системе рибонуклеаза + цитидин-3'-фосфат при pH 6,7 (все растворы содержали 0,1 М  $KNO_3$  и  $2 \cdot 10^{-5}$  М индикатор хлорфеноловый красный).

А. Изомеризация фермента.  $E_0 = 1,41 \cdot 10^{-4}$  М. Масштаб по оси абсцисс — большое деление шкалы соответствует 1 мсек;  $\tau_1 = 0,792$  мсек. Б. Взаимодействие фермента с субстратом.  $E_0 = 1,35 \cdot 10^{-4}$  М,  $S_0 = 2,87 \cdot 10^{-4}$  М. Масштаб по оси абсцисс — большое деление соответствует 100 мсек;  $\tau_2 = 90$  мсек. Взаимодействие фермента с субстратом вызывает вначале быстрое уменьшение поглощения. Наблюдающееся в дальнейшем очень небольшое увеличение поглощения вызвано началом процесса релаксации, который связан с изомеризацией фермента, показанной выше. В. Внутримолекулярный процесс.  $E_0 = 1,22 \cdot 10^{-4}$  М,  $S_0 = 1,10 \cdot 10^{-3}$  М. Масштаб по оси абсцисс — большое деление соответствует 100 мсек;  $\tau_3 = 113$  мсек. По вертикальной шкале во всех случаях отложена оптическая плотность в условных единицах (уменьшается снизу вверх).

что скорости бимолекулярных процессов и, следовательно, различные  $\tau_i$ , с которыми они связаны, зависят от начальных (равновесных) концентраций, тогда как



скорости мономолекулярных процессов [например, таких, как  $ES \rightleftharpoons EP$  в уравнении (IV.41)] от них не зависят.

### Измерения методом температурного скачка

Схематическое изображение установки для исследований по методу температурного скачка приведено на фиг. 50. Время ответа (время нагрева) зависит от силы электрического разряда в реакционной ячейке, для осуществления которого требуется раствор электролита. Поэтому этот метод особенно пригоден для измерения параметров таких ферментативных реакций, при которых для достижения оптимальной активности требуется значительная концентрация электролита ( $\sim 0,1 M$ ).

На фиг. 51 и 52 приведены фактические экспериментальные данные, показывающие, как изменяется оптическая плотность раствора при сдвиге химического равновесия как для одноступенчатого, так и многоступенчатого процессов. Следует отметить, что на фиг. 52 можно различить три времени релаксации.

### ЛИТЕРАТУРА

- Gutfreund H., An Introduction to the Study of Enzymes, Wiley, New York, 1965.
- Dixon M., Webb E. C., Enzymes, 2nd ed., Longmans, Green, London, 1964. (М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, изд-во «Мир», М., 1966.)
- Neilands J. B., Stumpf P. K., Outlines of Enzyme Chemistry, 2nd ed., Wiley, New York, 1958.
- Perutz M. F., Bolton W., Diamond R., Muirhead H., Watson H. C., Structure of Hemoglobin, Nature, 203, 687 (1964).
- Gerhart J. C., Pardee A. B., The Effect of the Feedback Inhibitor, CTP, on Subunit Interactions in Aspartate Transcarbamylase, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 491 (1963).
- Monod J., Wyman J., Changeux J. P., On the Nature of Allosteric Transitions, J. Mol. Biol., 12, 88 (1965).
- Eigen M., de Maeyer L., Relaxation Methods, in Investigations of Rates and Mechanisms of Reactions (Friess S. L., Lewis E. S., Weissberger A., eds.), Vol. VIII, Part II, p. 896, Interscience, New York, 1963.
- Eigen M., Hammes G. G., Elementary Steps in Enzyme Kinetics, Advan. in Enzymol., 25, 1 (1963).
- Roughton F. J. W., Chance B., Rapid Reactions, in Investigations of Rates and Mechanisms of Reactions (Friess et al., eds.), Vol. VIII, Part II, p. 703, Interscience, New York, 1963.



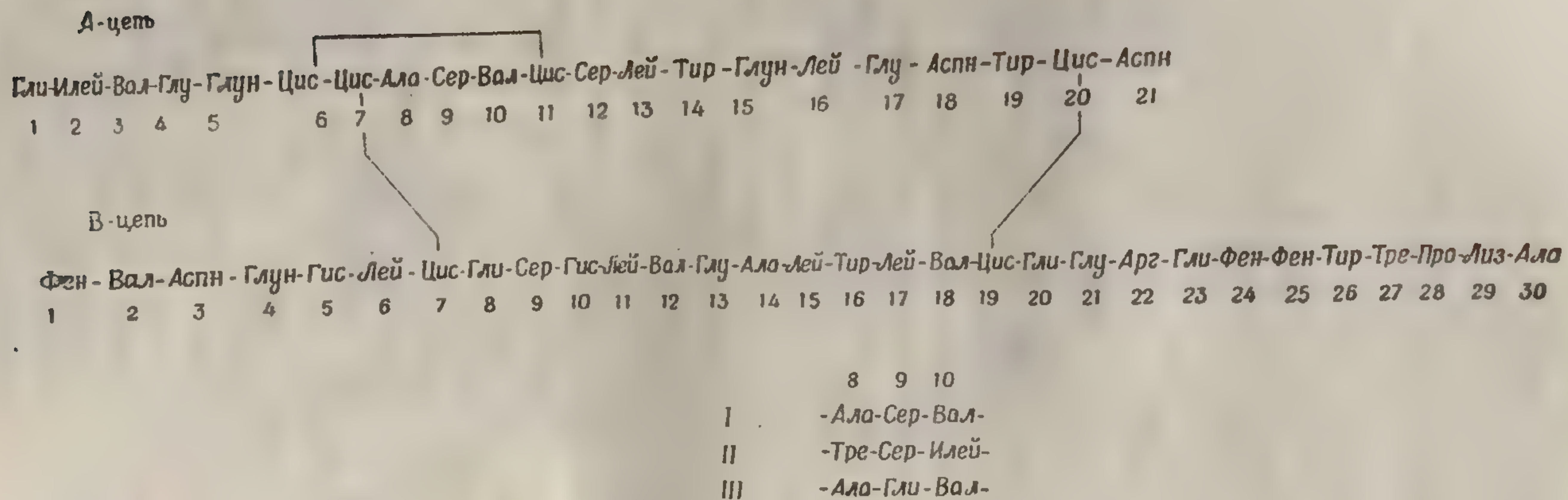
## ГЛАВА V

### АНАТОМИЯ ФЕРМЕНТОВ

Рассмотрев основные положения кинетики ферментативных реакций, перейдем теперь к обсуждению экспериментальных данных по кинетике, полученных для ряда конкретных фермент-субстратных систем, и к анализу механизмов реакций. Именно так обычно поступают при выяснении механизмов реакций, в которых катализаторами служат относительно небольшие органические молекулы. Для реакций, катализируемых органическими соединениями в гомогенных растворах, в отличие от ферментативных реакций химическое строение всех реагентов обычно хорошо известно (или исследователю предстоит сделать выбор из очень небольшого числа возможных структур). Достигнутый в настоящее время в органической химии уровень знаний позволяет не только изобразить структуры всех (стабильных) участников химической реакции, но и охарактеризовать их пространственную конфигурацию, во многих случаях строго заданную. При ферментативном катализе мы сталкиваемся с молекулами, имеющими значительно более сложную структуру. Целесообразно поэтому начать с рассмотрения некоторых общих аспектов химического строения и конформации белков-ферментов.

Впервые химическая структура белка (гормон инсулин) была установлена Сэнгером с сотрудниками. Это исследование явилось очень важным шагом на пути к пониманию биологической функции белка в свете структурных данных. Оно показало, что есть возможность расшифровать полную ковалентную структуру белка, и это послужило мощным толчком к исследованию строения других белков. Сам факт успешной расшифровки структуры инсулина свидетельствовал о том,





Ф и г. 53. Последовательность аминокислот в бычьем инсулине и в инсулинах овцы и свиньи.  
I — бычий инсулин; II — инсулин свиньи; III — инсулин овцы.



что во всех молекулах инсулина у данного вида животных последовательность аминокислот, по-видимому, одинакова или почти одинакова (правомерность такого заключения станет ясной при ознакомлении с описанным ниже методом определения строения белка). Сэнгер с сотрудниками показали, что молекулы инсулина, выделенные из тканей разных видов млекопитающих, лишь незначительно различаются по своей аминокислотной последовательности. Так, бычий инсулин и инсулины овцы и свиньи отличаются друг от друга только одной аминокислотой (фиг. 53)<sup>1</sup>.

### 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АМИНОКИСЛОТ В БЕЛКАХ

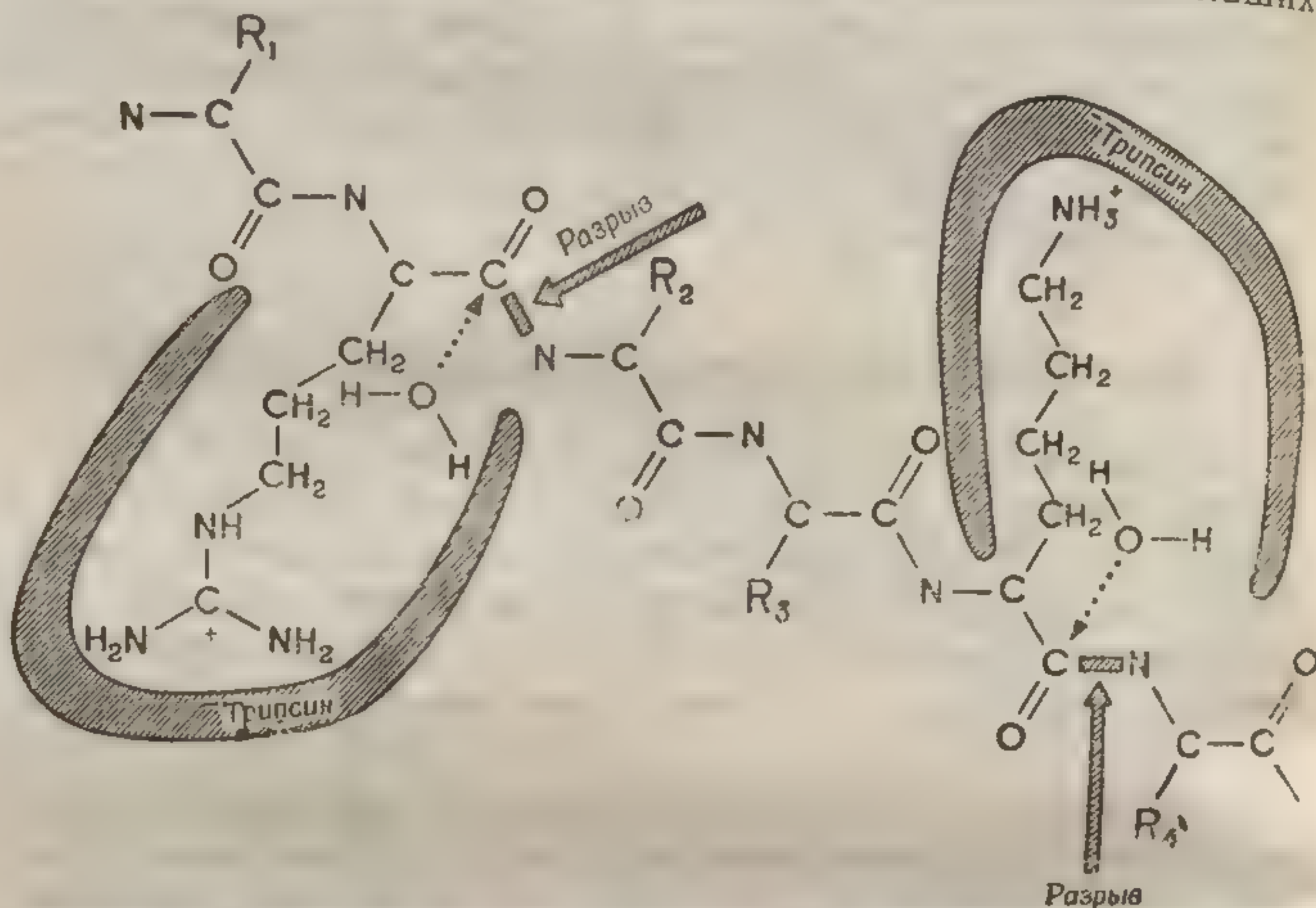
Со многими применяемыми в настоящее время методами определения последовательности аминокислот в белках можно познакомиться на классическом примере инсулина. Инсулин был выбран в качестве объекта для определения аминокислотной последовательности главным образом из-за небольших размеров его молекулы

<sup>1</sup> Поскольку частота спонтанных мутаций выражается величиной, значительно превосходящей величину, обратную времени, которое должно пройти для того, чтобы в процессе эволюции возник какой-либо вид млекопитающих, очевидно, что доминирующим биологическим фактором, который определяет существующие последовательности аминокислот в белках, являются не *мутации*, а *отбор*. Это в свою очередь свидетельствует о важности (на биологическом уровне) высокоспецифичной аминокислотной последовательности любого индивидуального белка. То обстоятельство, что не все аминокислотные остатки данной полипептидной последовательности играют решающую роль в ферментативном катализе, еще не означает, что та или иная специфическая аминокислотная последовательность вообще несущественна. Различные важные для клеточных белков свойства (способность к агрегации — дезагрегации, к адсорбции на субклеточных структурах и к диффузии, растворимость в клеточных жидкостях, конформационная стабильность и вязкость) могут зависеть от строения тех частей белковой молекулы, которые не влияют непосредственно на каталитическую активность.

В данной книге мы только мимоходом будем касаться тех структурных особенностей белков, которые не связаны с каталитической активностью; однако мы не станем утверждать (как это можно было бы сделать на основании одних только опытов *in vitro*), что значительная часть аминокислотной последовательности в белках не имеет существенного биологического значения.



(мол. вес около 6000). Кроме того, Сэнгер ранее показал, что молекулу инсулина можно расщепить на две приблизительно равные части путем разрыва дисульфидных связей и, следовательно, задачу определения аминокислотной последовательности можно было решать в отдельности для двух относительно небольших

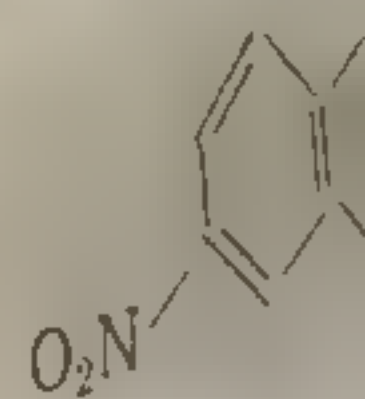


Фиг. 54. Субстратная специфичность в реакциях гидролиза, катализируемых трипсином.

полипептидных цепей (одна цепь содержит 21, а другая — 30 аминокислотных остатков).

Первая стадия исследования заключалась в расщеплении каждой из этих двух цепей специфичным протеолитическим ферментом (т. е. ферментом, разрывающим пептидные связи). Было установлено, что наиболее избирательным действием обладает *трипсин*, который разрывает только пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков аргинина и лизина (фиг. 54). Исходя из аминокислотного состава каждой цепи, можно было заранее рассчитать число *триптических* пептидов, которое должно быть получено (при условии что все молекулы инсулина имеют одинаковую аминокислотную последовательность).

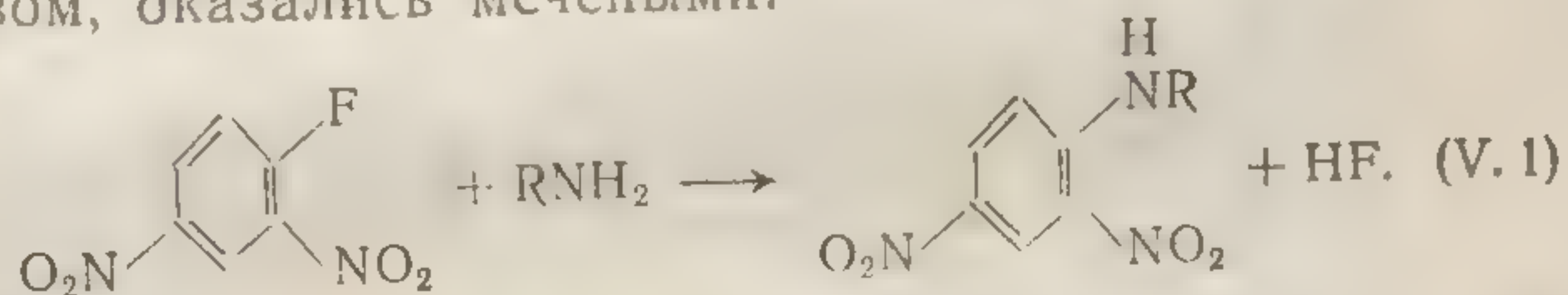
Из триптических хроматографических даемое число триптических пептидов (но не атакованных аминокислотных остатков) желтым образом, оказавшимся



Обработка этих данных дала возможность выделить кислоты каждого пептида и опровергнуть соответствующие выводы о последовательности пептидов. Задача Сэнгера — полного гидролиза — к такому неполному результату привела различные пробы. Эти пробы, составленные из аминокислот в определенное время, не удовлетворяют для опровержения в принципе возможности расщепления пептидов химическим методом, отщепления аминного или глутамида.

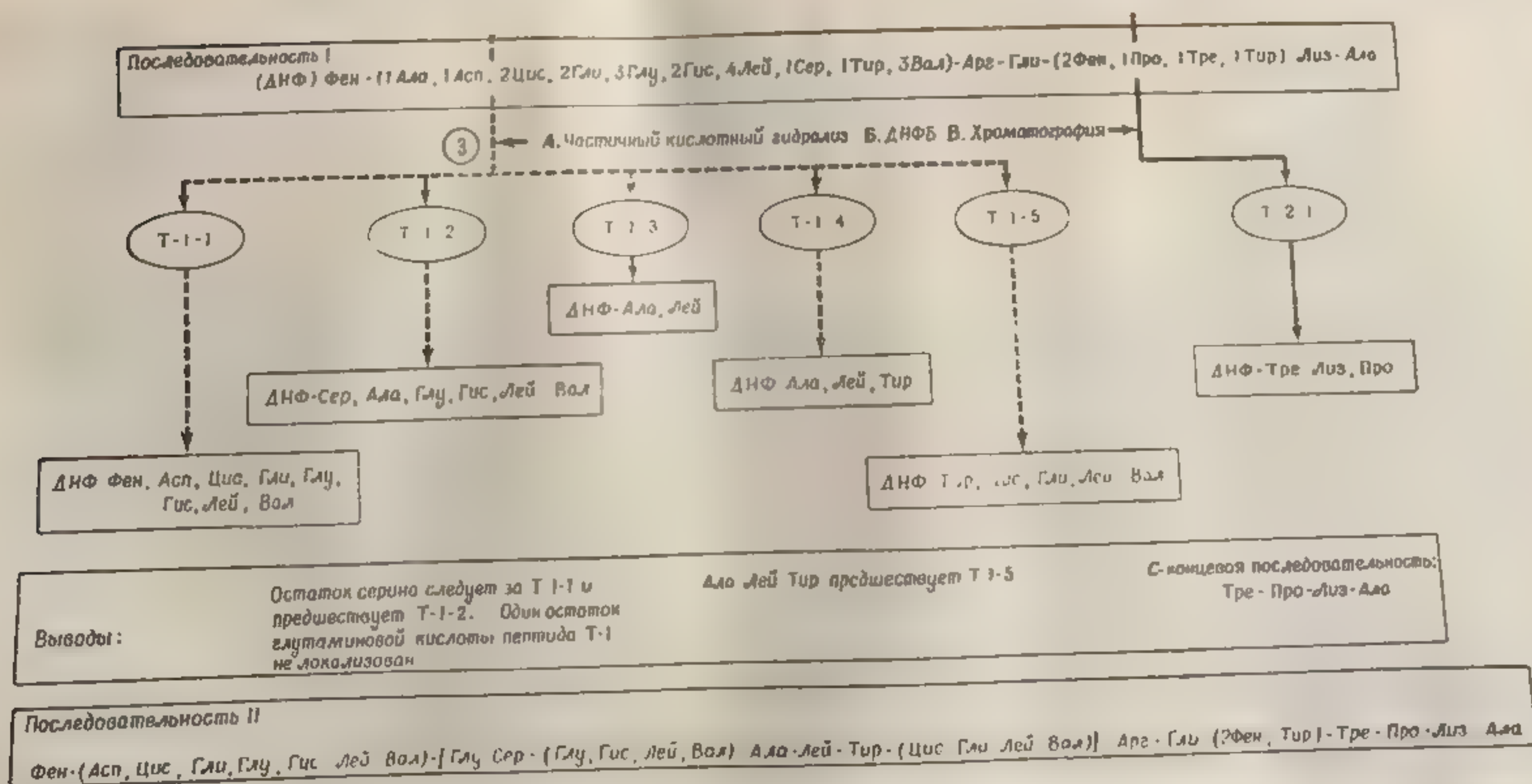
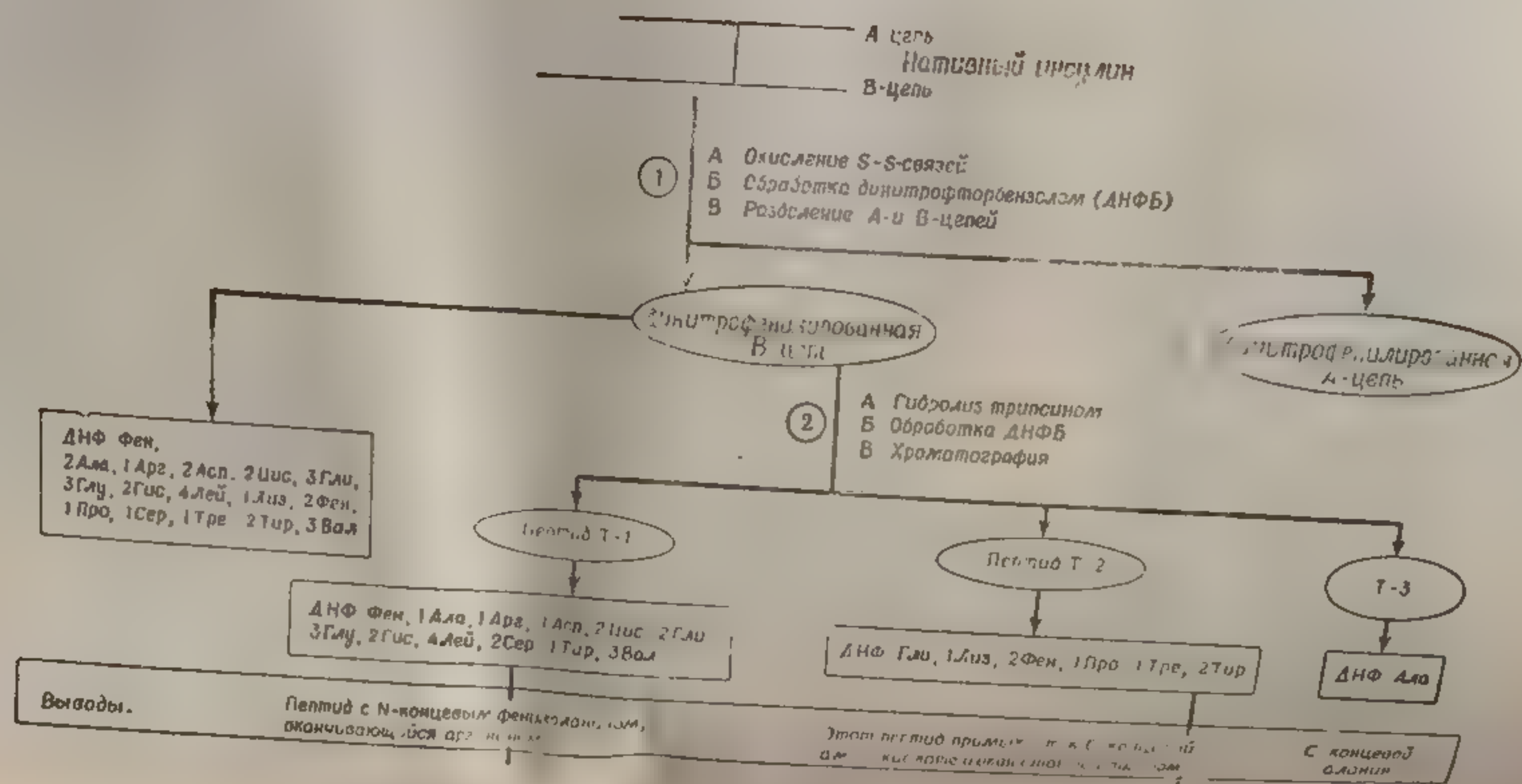


Из триптических гидролизатов каждого полипептида хроматографическими методами было выделено ожидаемое число фрагментов. В результате обработки выделенных триптических пептидов динитрофторбензолом—реагентом, который атакует свободные аминогруппы (но не атакует пептидный азот), — все N-концевые аминокислотные остатки были переведены в соответствующие желтые динитрофенилпроизводные и, таким образом, оказались мечеными:



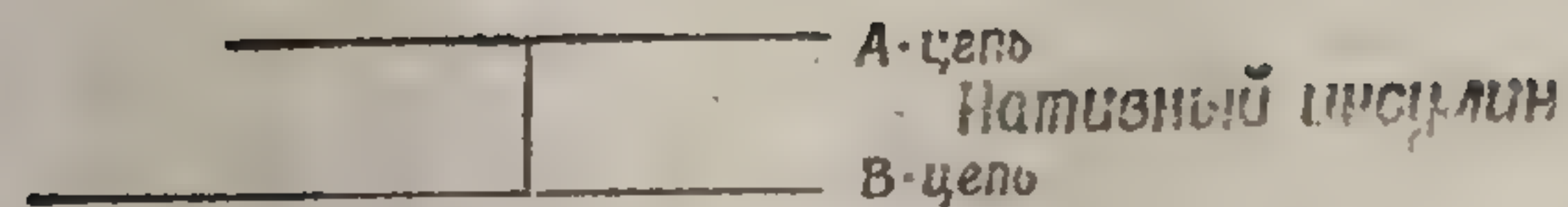
Обработка этим реагентом нерасщепленных полипептидов дала возможность определить N-концевые аминокислоты каждой из двух полипептидных цепей. Затем был проведен полный кислотный гидролиз каждого из пептидов и определен их аминокислотный состав. Эти этапы соответствуют стадии 2 на фиг. 55. Для дальнейшего выяснения структуры требовалось определить последовательность аминокислот в каждом триптическом пептиде и линейное расположение этих триптических пептидов в полипептидной цепи. Первую из этих задач Сэнгер решал, пользуясь методом *неполного кислотного гидролиза*. Триптические пептиды подвергались такому неполному гидролизу. При этом образовывались различные продукты (см. стадию 3 на фиг. 55). Выделение этих продуктов и определение их аминокислотного состава позволили установить последовательность аминокислот в отдельных триптических пептидах. В настоящее время неполный кислотный гидролиз редко используется для определения последовательности аминокислот в пептидах. Современные методы основаны на принципе *последовательного*, а не *беспорядочного* расщепления пептидной цепи. Такое последовательное расщепление может быть осуществлено двумя путями: химическим путем или с помощью какого-нибудь фермента, отщепляющего одну аминокислоту за другой с аминного или с карбоксильного конца пептида. Карбоксипептидаза отщепляет аминокислоты только с





Фиг. 55. Определение последовательности аминокислотных остатков в В-цепи инсулина (схема эксперимента).





- ①
- А Окисление S-S-связей
  - Б Сброска динитрофторбензолом (ДНФБ)
  - В Разделение А-и В-цепей

Динитрофенилированная В-цепь

Динитрофенилированная А-цепь

ДНФ-Фен,  
2Ала, 1Арг, 2Асп, 2Цис, 3Гли,  
3Глу, 2Гис, 4Лей, 1Лиз, 2Фен,  
1Про, 1Сер, 1Тре, 2Тир, 3Вал

②

- А Гидролиз трипсином
- Б Обработка ДНФБ
- В Хроматография

Пептид Т-1

Пептид Т-2

Т-3

ДНФ-Фен, 1Ала, 1Арг, 1Асп, 2Цис, 2Гли,  
3Глу, 2Гис, 4Лей, 2Сер, 1Тир, 3Вал

ДНФ-Гли, 1Лиз, 2Фен, 1Про, 1Тре, 2Тир

ДНФ-Ала

Выводы:

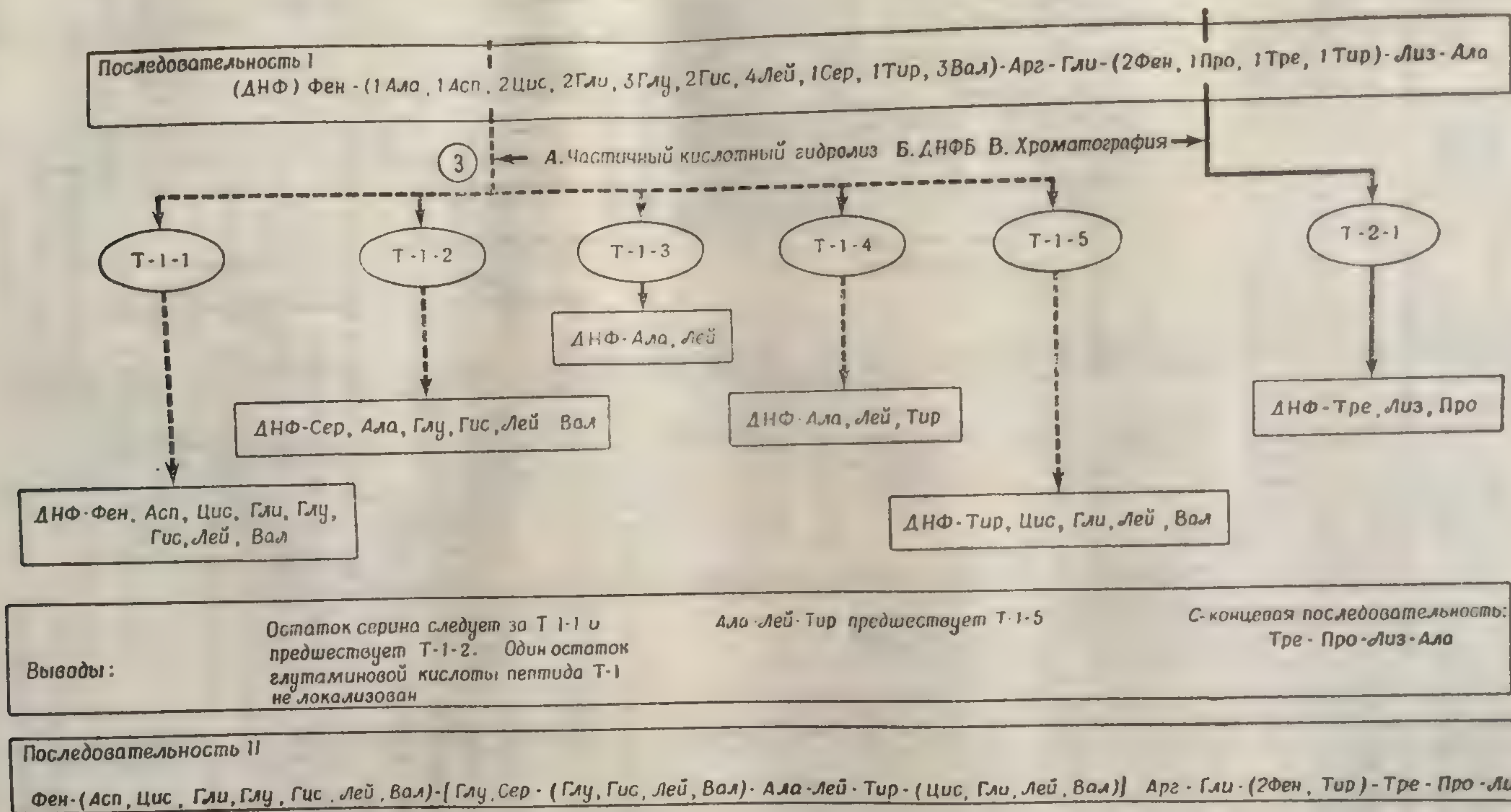
Пептид с N-концевым фенилаланином,  
оканчивающийся аргинином

Этот пептид примыкает к С-концевой  
аминокислоте и оканчивается лизином

С-концевой  
аланин

Последовательность I  
... 2Гли, 3Глу, 2Гис, 4Лей, 1Сер, 1Тир, 3Вал)-Арг-Гли-(2Фен, 1Про, 1Тре, 1Тир)-Лиз-Ала

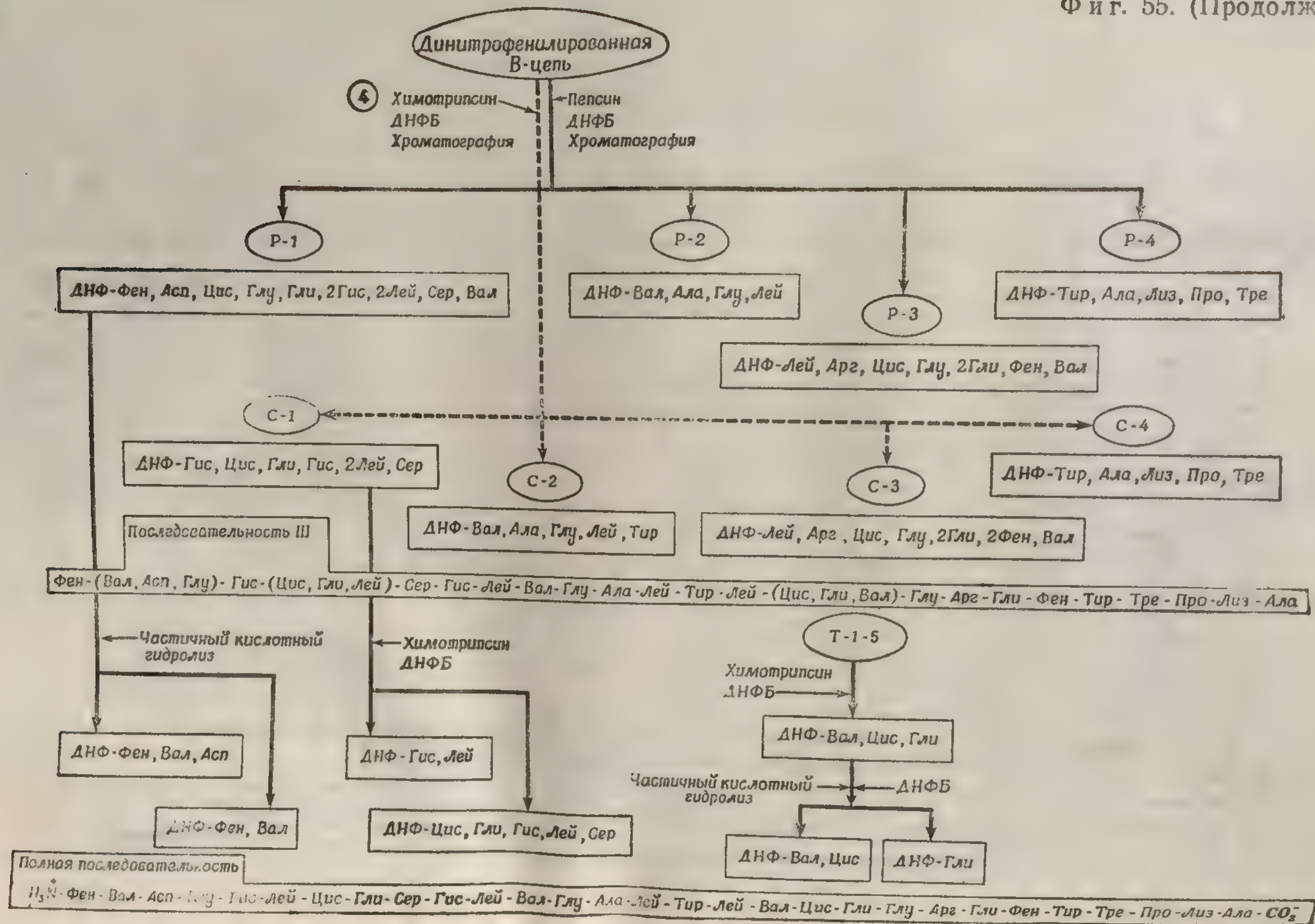




Ф и г. 55. Определение последовательности аминокислотных остатков в В-цепи инсулина (схема эксперимента).

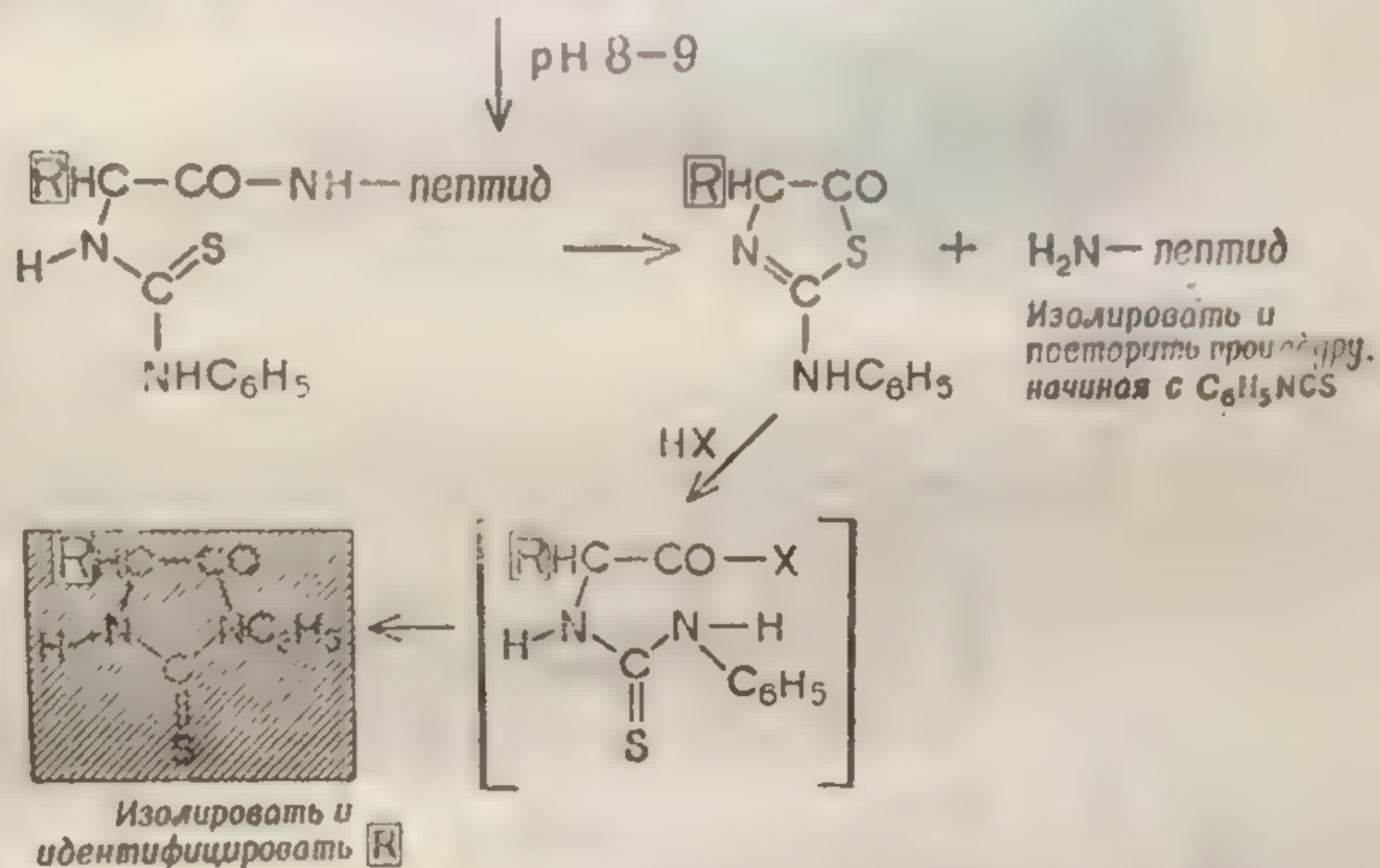
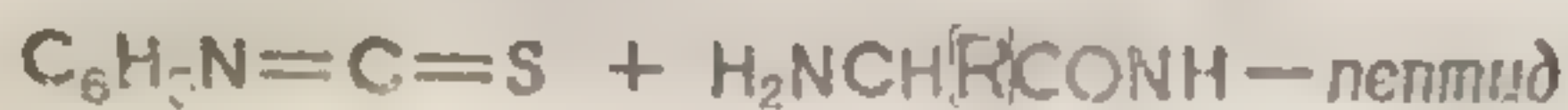


Ф и г. 55. (Продолжение.)





карбоксильного конца пептида, а лейцинаминопептидаза — только с аминного конца. При небольших концентрациях одной из этих двух пептидаз можно проследить во времени за отщеплением свободных аминокислот от пептидной цепи и на основании полученных данных установить аминокислотную последовательность.



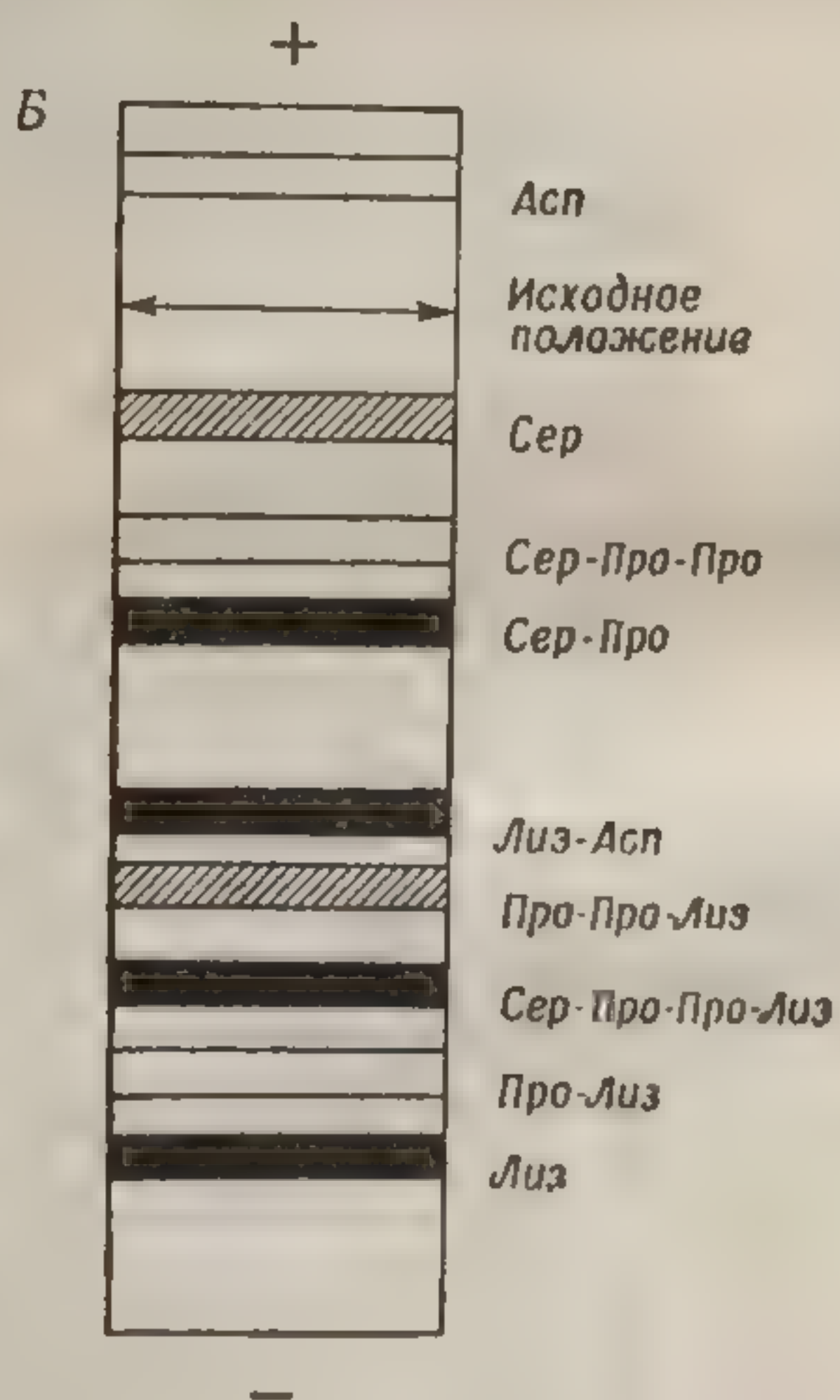
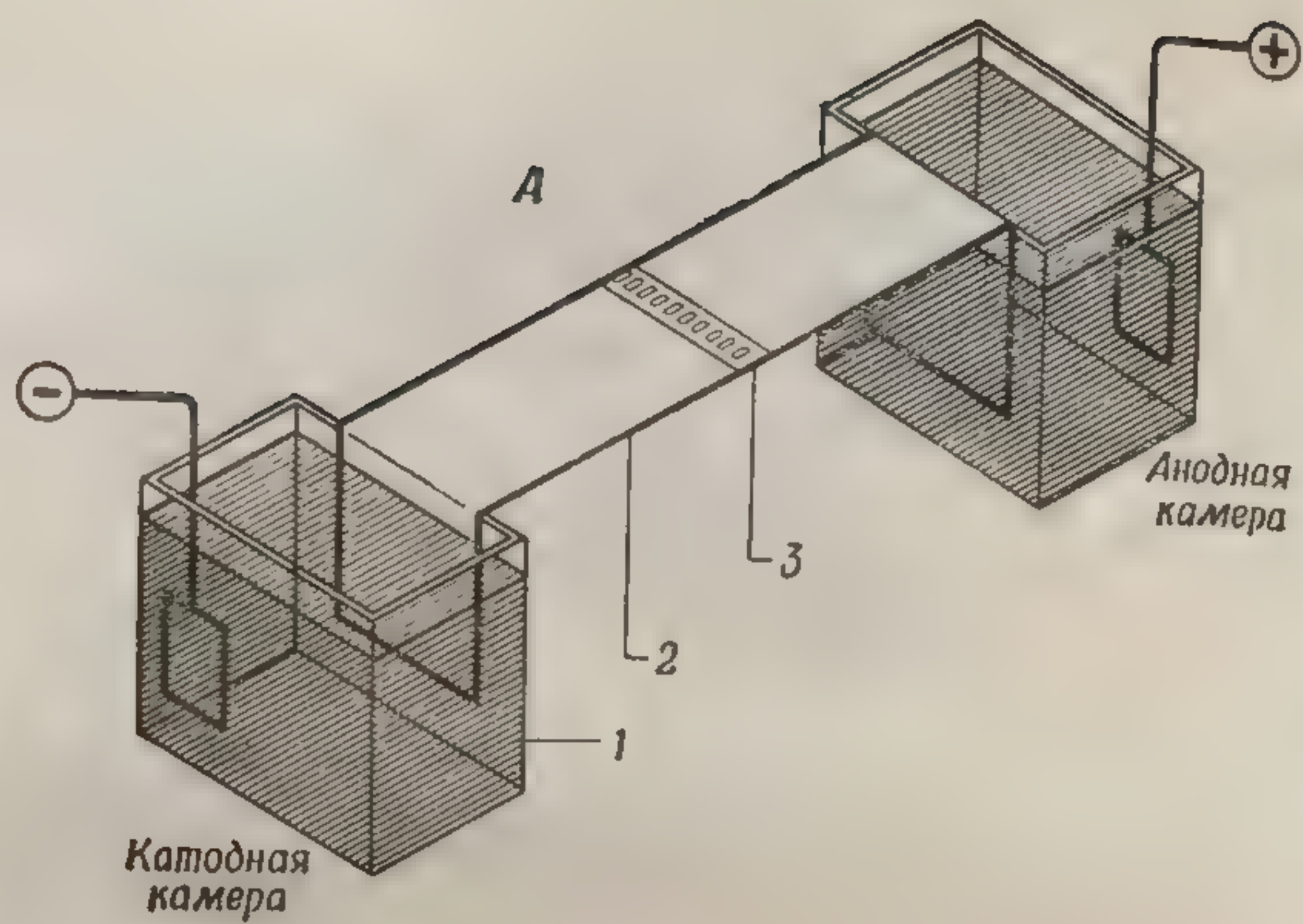
Фиг. 56. Расщепление по Эдману.

Однако ферменты, подобные карбоксипептидазе и лейцинаминопептидазе, имеют ограниченное применение: во-первых, они отщепляют не все аминокислотные остатки и, во-вторых, при интерпретации полученных результатов часто возникают трудности из-за того, что различные остатки отщепляются с разной скоростью.

В настоящее время для определения последовательности аминокислот в пептидах чаще всего применяется метод Эдмана, основанный на реакции с фенилизотиоцианатом (фиг. 56), при которой отщепляется N-концевая аминокислота. Повторяя реакцию, отщепляют следующий N-концевой остаток и т. д.

Очередность расположения триптических пептидов можно установить только путем расщепления полипептидной цепи не по тем связям, которые разрываются



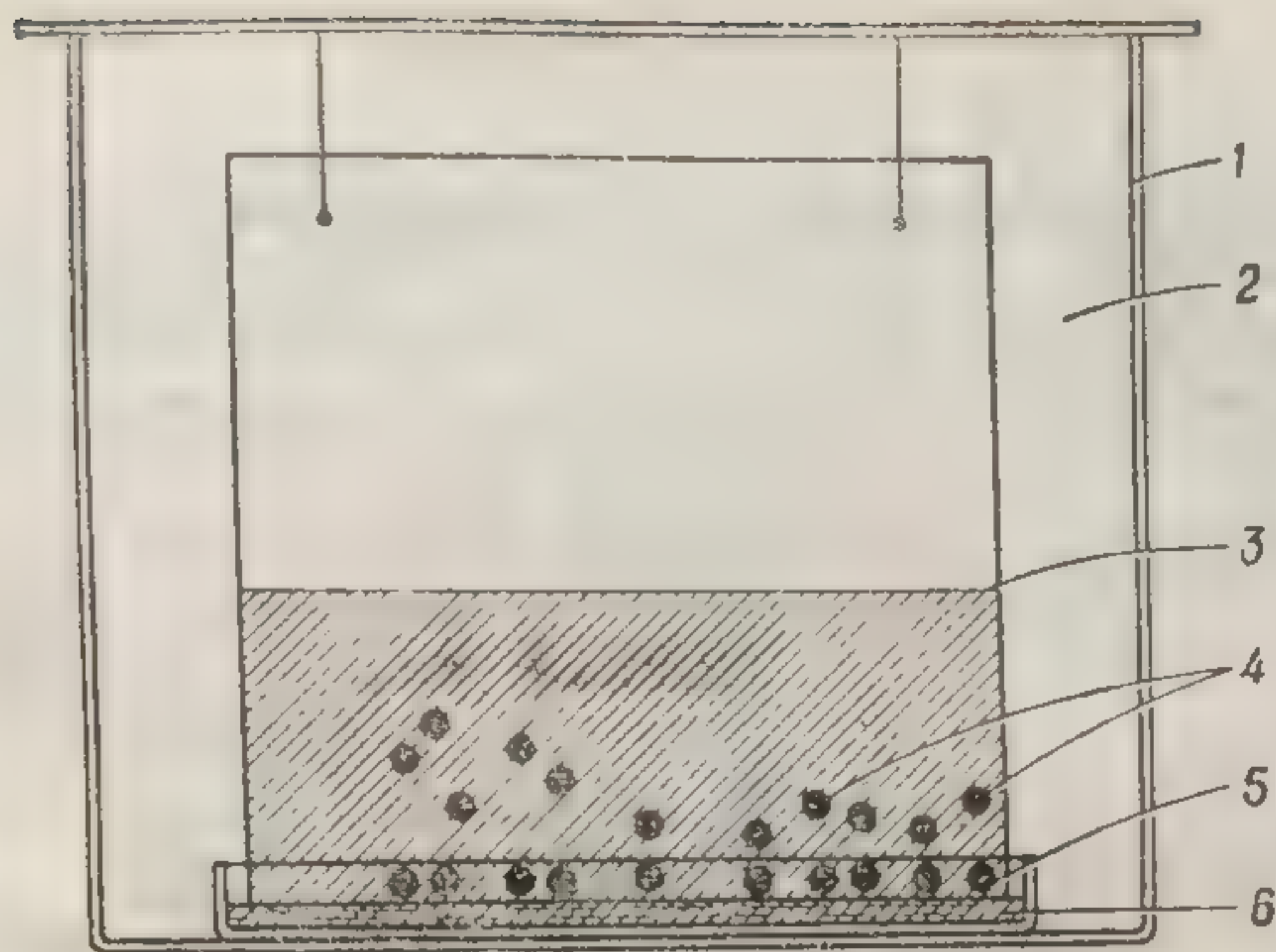


Ф и г. 57.

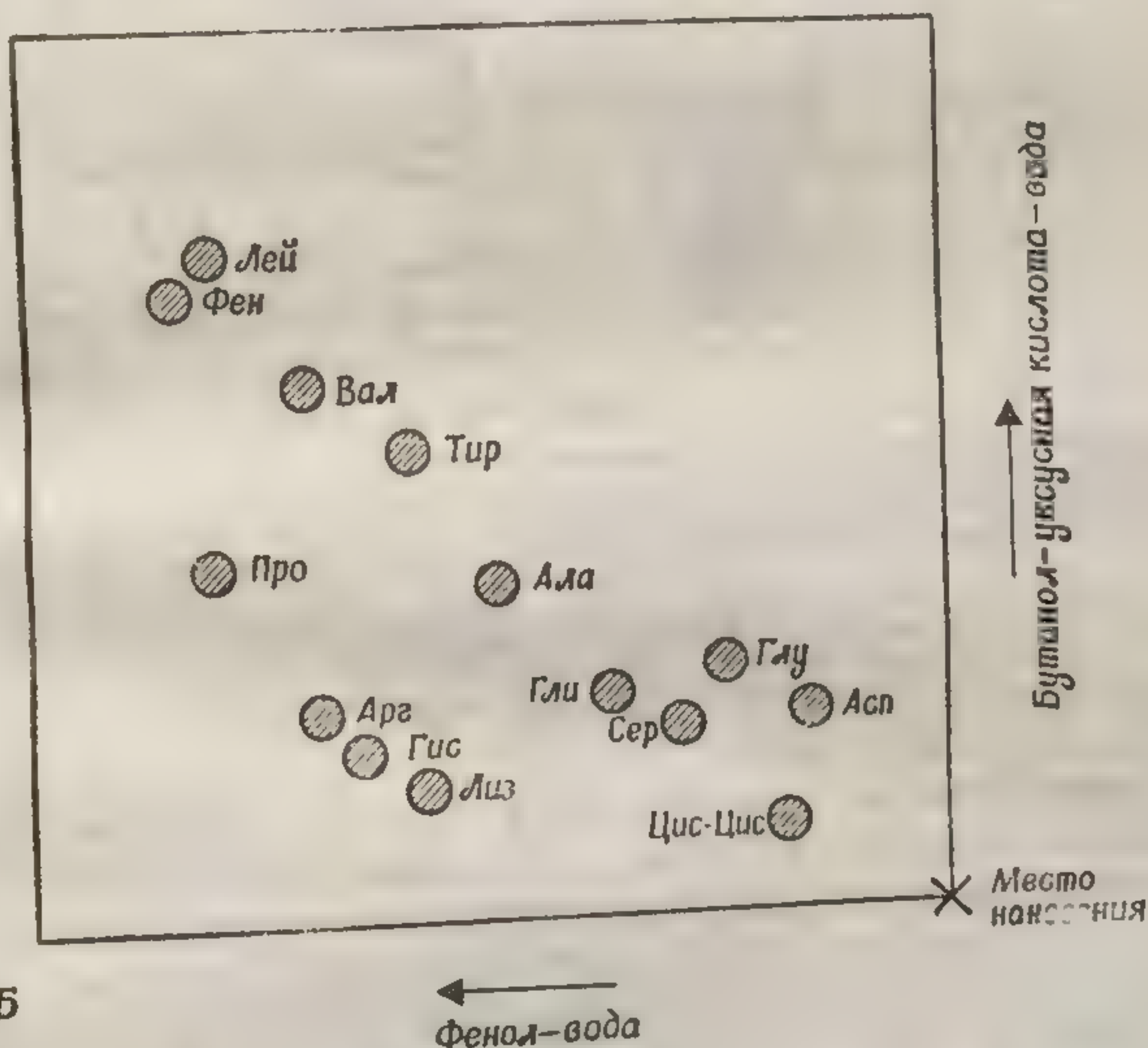
А. Схема прибора для высоковольтного электрофореза на бумаге.  
1 — буфер; 2 — бумага, смоченная буфером; 3 — исходное положение смеси.  
Б. Одномерная бумажная электрофореграмма, проявленная нингидрином.

А. Схема прибора  
1 — стеклянный сосуд; 2 —  
растворителя; 4 — разд  
Б. Проявленная двумя





А



Б

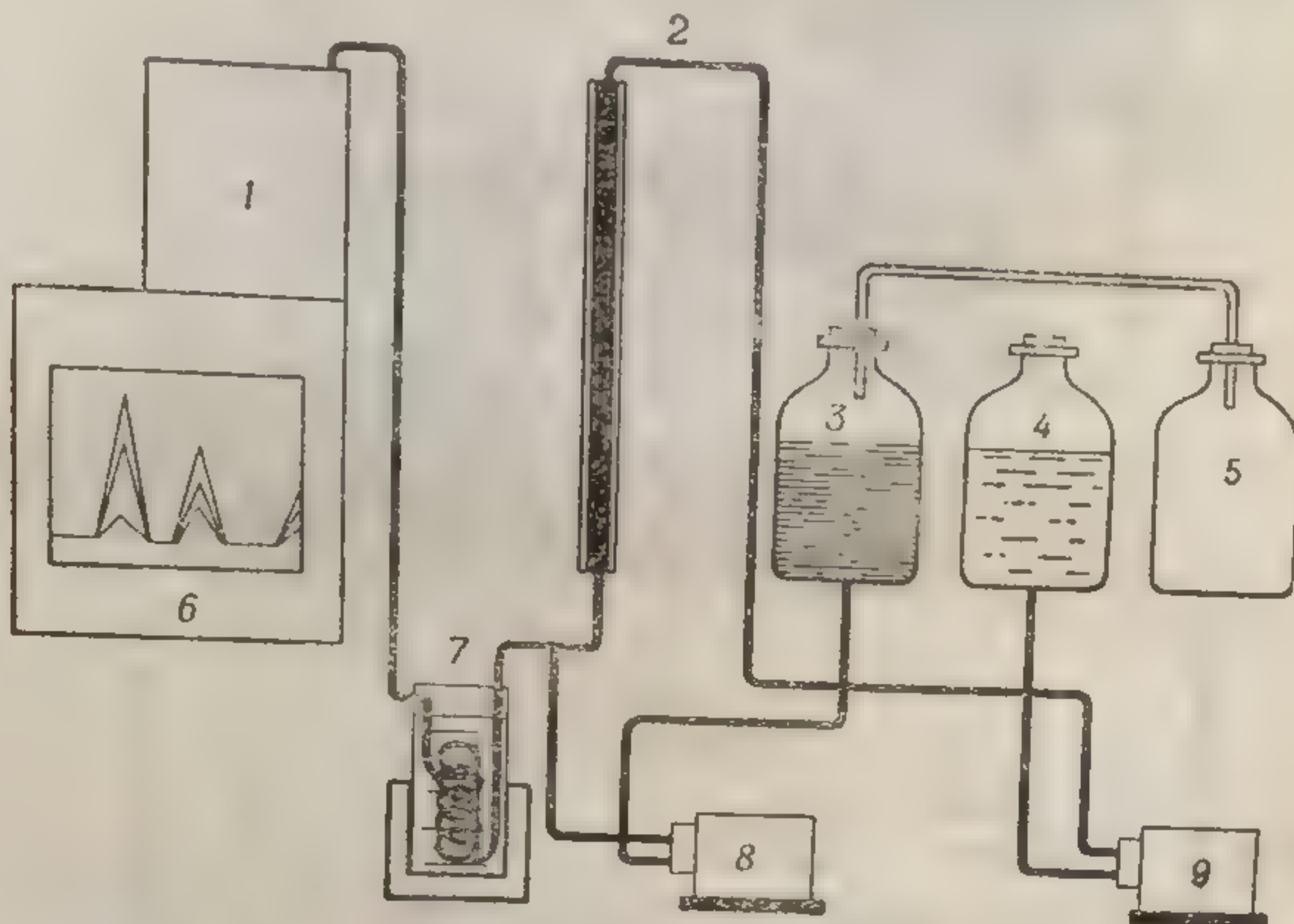
Ф и г. 58.

А. Схема прибора для восходящей хроматографии на бумаге. 1 — стеклянный сосуд; 2 — камера, наполненная парами растворителя; 3 — фронт растворителя; 4 — разделяемые компоненты; 5 — исходное положение смесей; 6 — смесь растворителей.

Б. Проявленная двумерная хроматограмма после разделения смеси в двух различных системах растворителей.



трипсином, а по каким-либо другим (стадия 4 на фиг. 55). Методика, примененная Сэнгером, включала расщепление полипептидных цепей инсулина двумя другими ферментами — химотрипсином и пепсином. Ни один



Фиг. 59. Аминокислотный анализатор.

Аминокислоты разделяют путем извлечения растворителем (буфером) из колонки с ионообменной смолой. Элюат проявляют реакцией с нингидриновым реагентом. Размещение во фракциях элюата цветных продуктов реакций отдельных аминокислот сопоставляют с хроматограммой стандартной смеси аминокислот (см. фиг. 60).

1 — фотометр; 2 — термостатированная колонка с ионообменником; 3 — сосуд с нингидриновым реагентом; 4 — сосуд с буфером; 5 — азот; 6 — регистрирующий прибор; 7 — кипящая водяная баня; 8 — насос для подачи нингидринового реагента; 9 — насос для подачи буфера.

из этих ферментов не является столь специфичным, как трипсин. Однако оба они обладают известной специфичностью, т. е. разрывают ограниченное число связей, в результате чего образуются (вначале) крупные пептиды. Располагая данными о последовательности аминокислот в триптических пептидах, можно затем определить в пептидах, полученных при химотриптическом гидролизе, зоны «перекрывания» двух или нескольких триптических пептидов и таким путем установить их последовательное расположение в полипептиде. После того как идентифицированы все «перекрывания», мож-

но установить последовательность аминокислот в исследуемой полипептидной цепи. Число «мостиков» между аминокислотами, выделяемых для того, чтобы показать неожиданную степень вероятности со степенью вероятности требуемых пептидных «мостиками» своеобразной последовательности в любой полипептидной цепи, которые характерны для узнавания «перекрывания» участков по составу «в общем значительном» можно было бы ожидать.

Особо ответственными являются последовательности, обеспечивающие разделение различных индивидуальных полипептидов. В результате полного гидролиза полипептидов пользуются такими методами, как бумага или на кол-

## 2. Дисперсия

Как уже отмечалось, дисперсия наряду с пептидными связями (S—S-связи) является стоящим фактором в ферментативном разложении поперечных связей.

Известны пептидные связи, например, в аминотерминальной или ε-аминогруппе лизина, в результате ферментативного расщепления, с которыми биологически активны обнаружены.



но установить последовательность аминокислот во всей исследуемой полипептидной цепи.

Число «мостиковых» пептидов, которые необходимо выделить для того, чтобы однозначно определить очередность расположения триптических пептидов, может показаться неожиданно малым, если сопоставить его со степенью вероятности чисто случайного нахождения требуемых пептидных фрагментов, способных служить такими «мостиками». Объясняется это уникальной и своеобразной последовательностью аминокислотных остатков в любой полипептидной цепи. Вообще специфические полипептидные последовательности имеют некоторые характерные особенности, которые помогают узнавать «перекрывания», хотя предсказать эти особенности заранее нельзя. Узнавание «перекрывающихся» участков по составу «мостиковых» пептидов оказывается в общем значительно более легкой задачей, чем можно было бы ожидать, исходя из теории вероятностей.

Особо ответственными операциями при определении последовательности аминокислот в пептидах являются разделение различных пептидных фрагментов и разделение индивидуальных аминокислот, полученных в результате полного гидролиза пептидов. Для этой цели пользуются такими методами, как хроматография на бумаге или на колонках (фиг. 57—60).

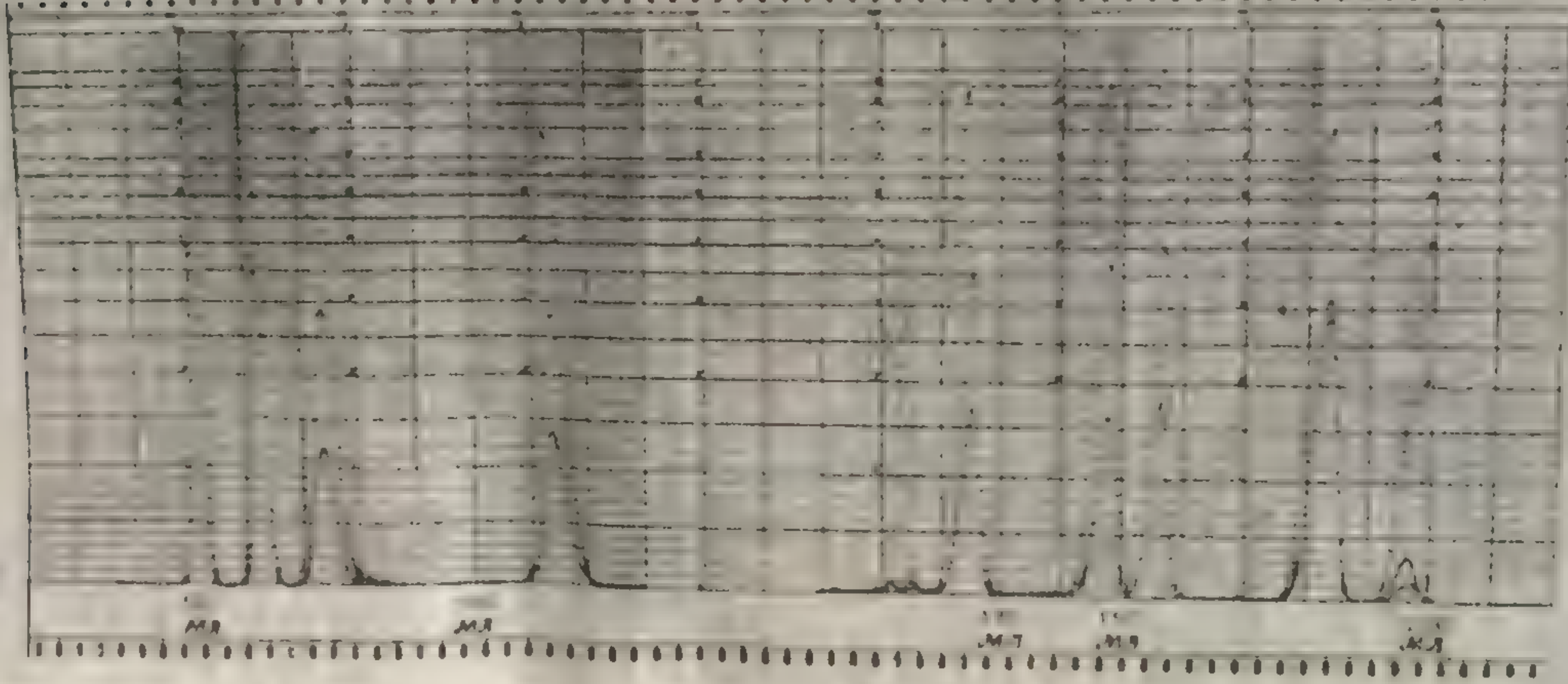
## 2. ДИСУЛЬФИДНЫЕ МОСТИКИ

Как уже отмечалось (фиг. 53), в молекуле инсулина наряду с пептидными имеются также дисульфидные связи (S—S-связи). Это единственный известный в настоящее время в ферментах тип ковалентной связи, образующий поперечные мостики<sup>1</sup>. В инсулине имеются

<sup>1</sup> Известны пептиды, в которых имеются другие виды ковалентных связей, например  $\gamma$ -пептидная связь в глутатионе ( $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин), а также связи между гидроксильной группой серина или  $\epsilon$ -аминогруппой лизина и карбонильными группами в некоторых природных антибиотиках. Такие пептиды синтезируются, по-видимому, в результате ферментативных процессов, отличающихся от тех, с которыми обычно связан биосинтез белков. В более крупных биологически активных белках связи такого типа до сих пор не обнаружены.



U



Глицерин

Аммиак

Метионин

Аспарагин

Гистидин

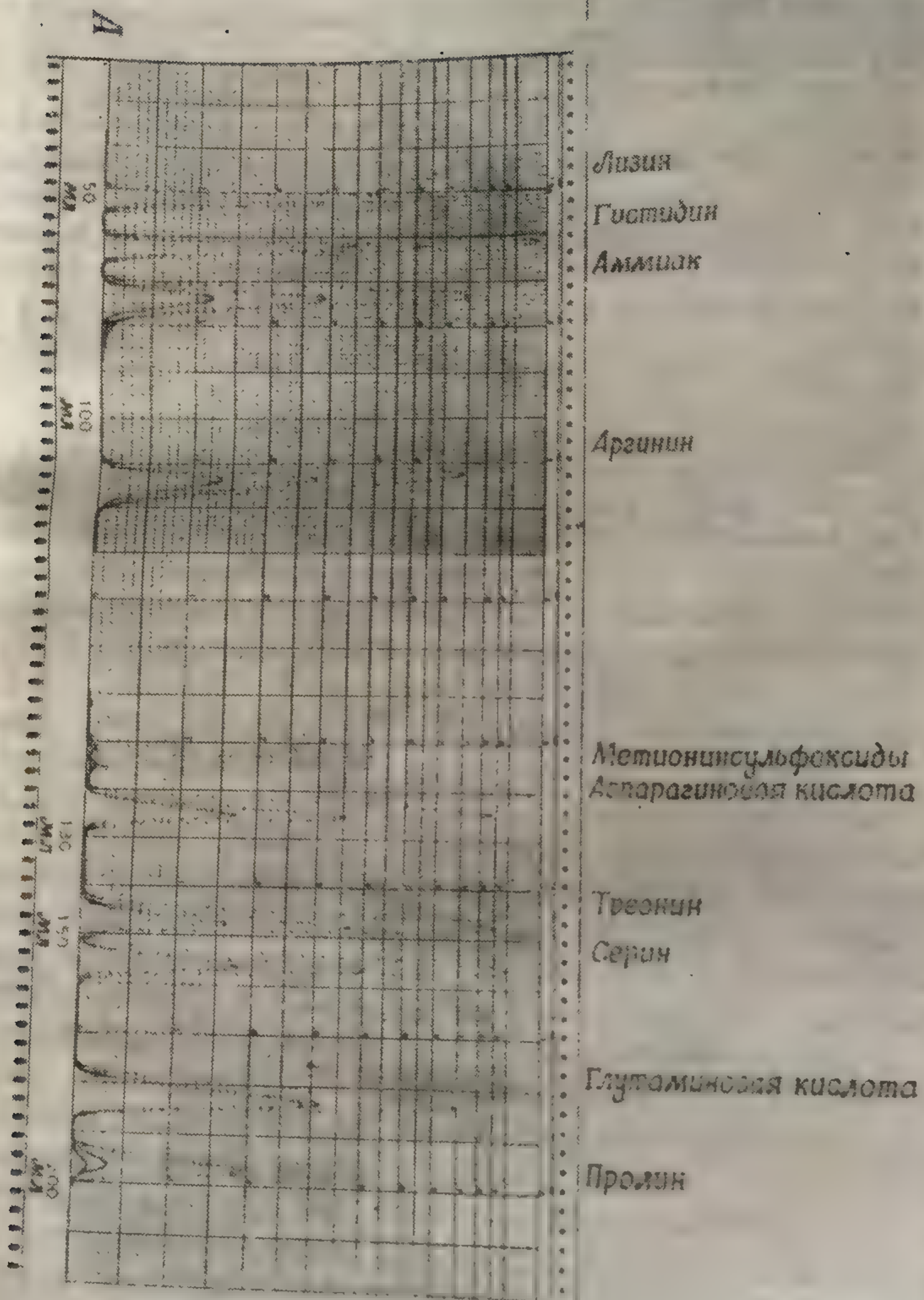
Пролин

Гистидин

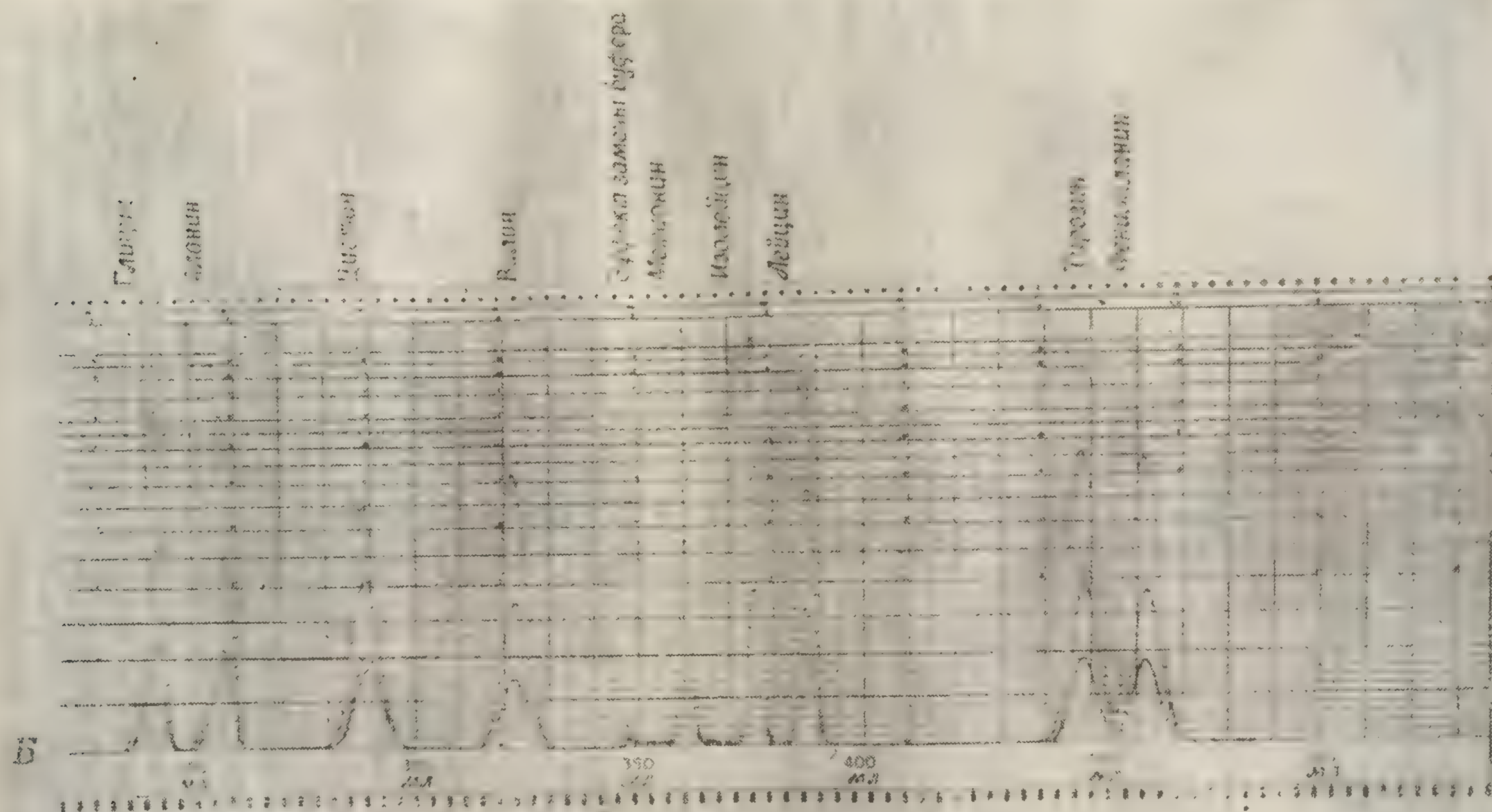
Аспарагин

Гистидин





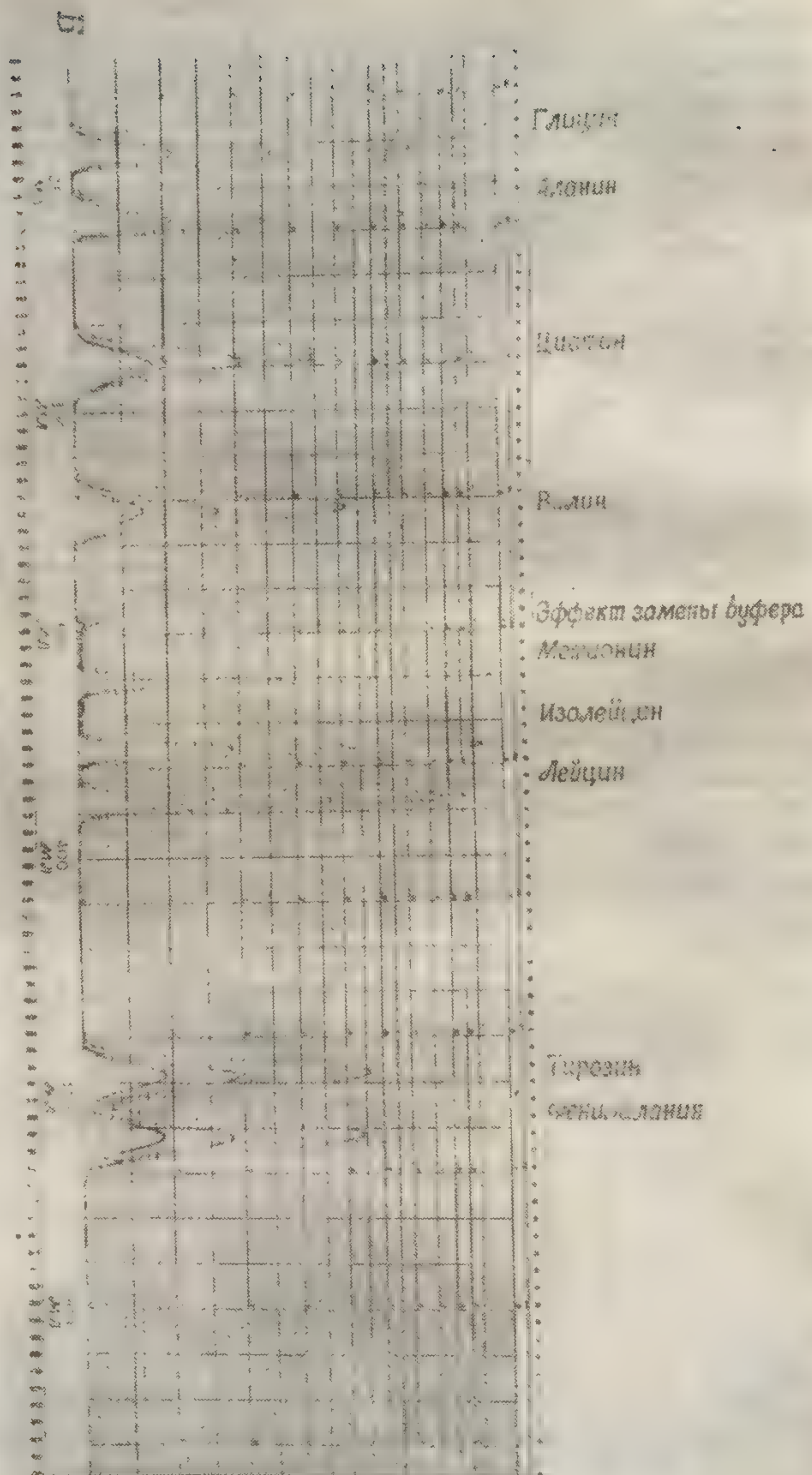




Ф и г. 60. Хроматограмма, получаемая на аминокислотном анализаторе.



Ф и г. 60. Хроматограмма, получаемая на аминокислотном анализаторе.

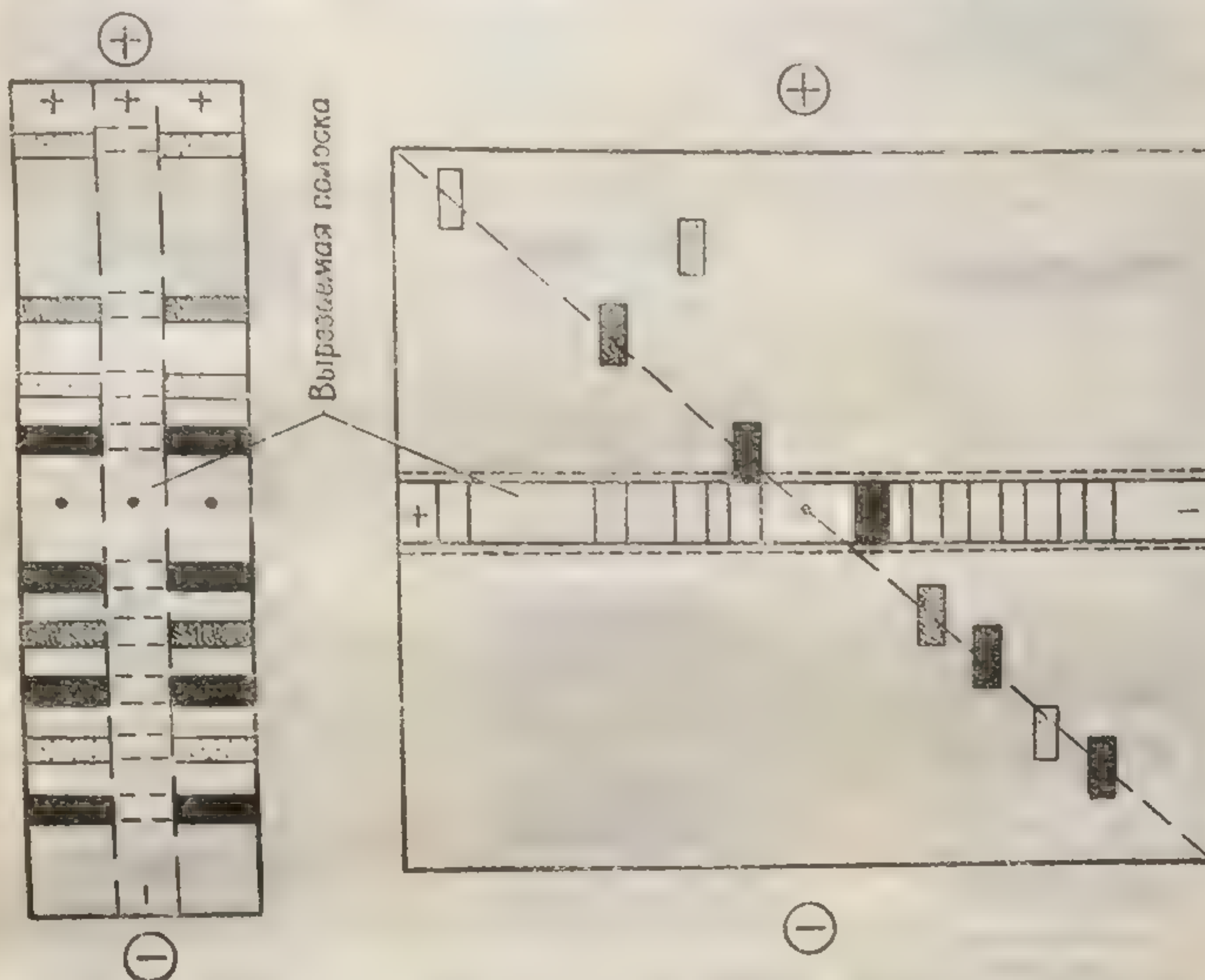








Для того чтобы установить расположение дисульфидных связей, расщепляют протеиназами нативный



Фиг. 62. «Диагональный» метод локализации дисульфидных связей в пептидах.

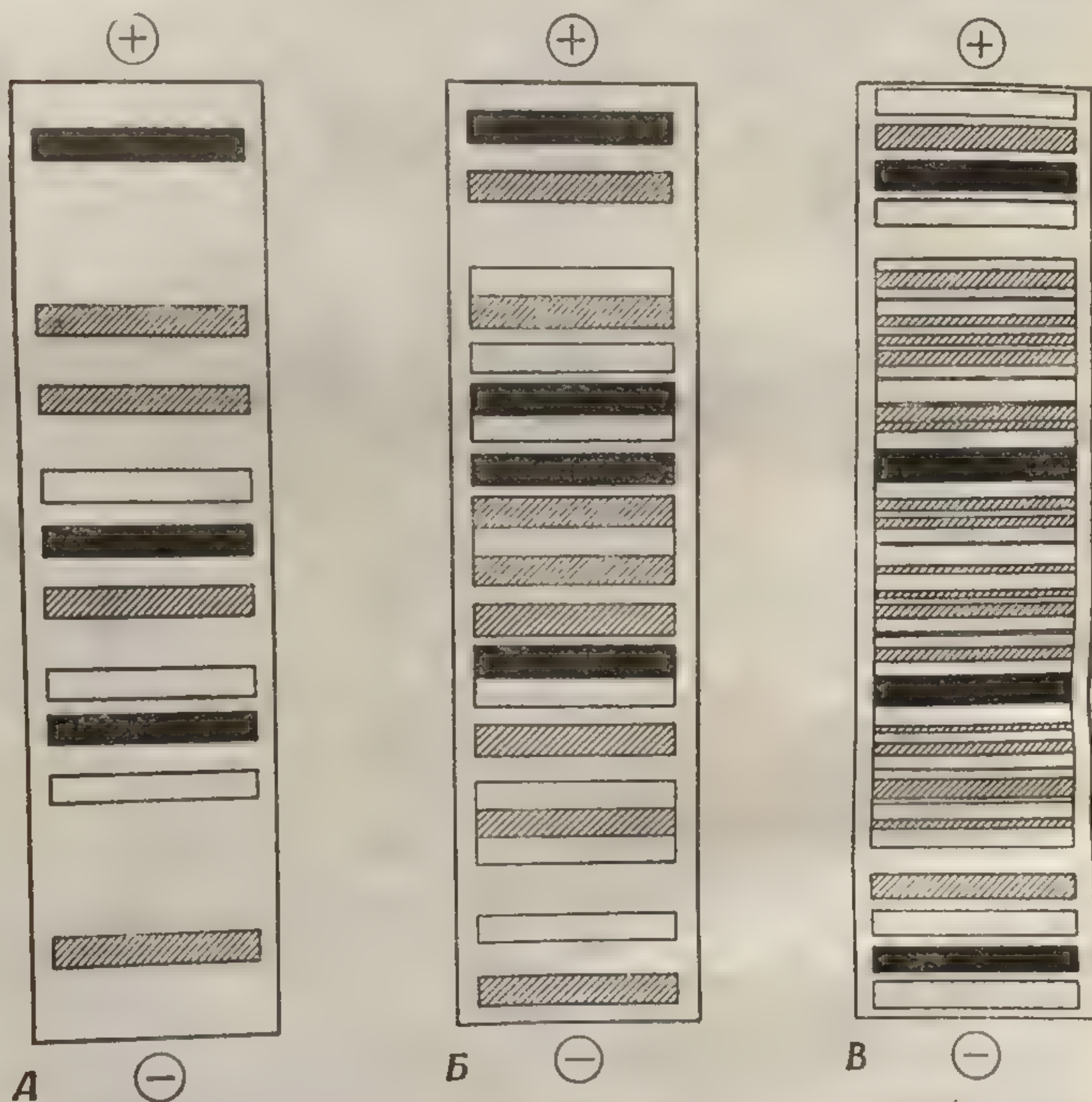
Полипептид расщепляют до небольших пептидов протеолитическим ферментом и проводят электрофоретическое разделение, как показано на фиг. 57, А. Затем электрофореграмму обрабатывают парами надмуравьиной кислоты, что приводит к окислительному расщеплению дисульфидных связей в пептидах (с образованием отрицательно заряженных сульфонов). Вырезанную (вертикальную) полоску обработанной электрофореграммы нашивают на середину нового листа бумаги в горизонтальном направлении (как показано в правой части фигуры) и снова проводят электрофоретическое разделение. Пептиды, которые остаются неизменными при окислении надмуравьиной кислотой (и, следовательно, не содержат дисульфидных связей), сохраняют прежнюю подвижность; поэтому они должны располагаться на второй электрофореграмме строго по диагонали. Те же пептиды, которые ранее содержали дисульфидные связи, после окислительного расщепления приобретают в среднем по одному дополнительному отрицательному заряду, так что их электрофоретическая подвижность изменяется. Эти пептиды располагаются вне диагонали и могут быть идентифицированы.

белок и белок с разорванными (окисленными) дисульфидными связями, а затем сравнивают полученные продукты. При расщеплении немодифицированного и модифицированного белка образуются различные пептидные фрагменты, как это видно из фиг. 55 и 62.



### 3. СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АГРЕГАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ В ОЛИГОМЕРНЫЕ СТРУКТУРЫ

Выше мы уже говорили о том, что многие ферменты построены из нескольких полипептидных субъединиц.



Фиг. 63. Определение числа различных полипептидных цепей в олигомерном белке по числу пептидных фрагментов, образующихся при триптическом расщеплении.

Изображены ожидаемые результаты для тетрамерного белка, имеющего полипептидные субъединицы одного типа (А), двух разных типов (Б) и четырех разных типов (В).

Эти субъединицы остаются соединенными благодаря ковалентным дисульфидным связям, водородным связям и взаимодействиям, обусловленным вандерваальсовыми силами. Субъединицы могут быть идентичными или раз-

ными. Для  
липептидных  
ются обычно  
ление натив  
ментом трип  
кислотный со  
и аргинина м  
должно обра  
При гидролиз  
тичных субъ  
различных т  
белка, состоя  
чественное о  
кислотных о  
фиг. 55) поз  
полипептидн  
содержания  
мощность ра  
же в том ст

#### 4. АКТИВН

Факторы  
тивного бел  
ствии с общ  
чать эти че

1. Перв
- тидные и д
2. Втори
- вания пепт
3. Трети
- или иной
- сокого уро
4. Четве
- в олигомер

1 Согласно  
турой поним  
фиксированн  
—СО—NH—

11 Зак.



ными. Для решения вопроса о том, идентичны ли полипептидные субъединицы данного фермента, пользуются обычно таким методом, как специфическое расщепление нативных полипептидов протеолитическим ферментом трипсином. Если известен суммарный аминокислотный состав белка, то по числу остатков лизина и аргинина можно предсказать число пептидов, которое должно образоваться в результате действия трипсина. При гидролизе олигомерного белка, состоящего из идентичных субъединиц, в общем случае образуется меньше различных триптических пептидов, чем при гидролизе белка, состоящего из разных субъединиц (фиг. 63). Качественное определение различных N-концевых аминокислотных остатков (например, по методу Сэнгера; фиг. 55) позволяет установить число различных видов полипептидных субъединиц. Количественное определение содержания концевых групп в молекуле белка дает возможность рассчитать число субъединиц в олигомере даже в том случае, когда субъединицы идентичны.

#### 4. АКТИВНЫЕ И НЕАКТИВНЫЕ КОНФОРМАЦИИ БЕЛКА

Факторы, которыми определяется конформация активного белка, разделяют на четыре типа. В соответствии с общепринятой номенклатурой мы будем обозначать эти четыре типа следующим образом:

1. *Первичная структура*: все ковалентные связи (пептидные и дисульфидные).

2. *Вторичная структура*: тип свертывания и складывания пептидных цепей, например  $\alpha$ -спираль<sup>1</sup>.

3. *Третичная структура*: способ укладки спирали или иной вторичной структуры в структуру более высокого уровня.

4. *Четвертичная структура*: организация субъединиц в олигомерной макромолекуле белка.

<sup>1</sup> Согласно более строгому определению, под вторичной структурой понимают трехмерное расположение полипептидного хребта, фиксированное водородными связями между пептидными звеньями —CO—NH— различных участков пептидной цепи. — Прим. ред.



Первичную структуру можно изучать при помощи относительно простых, хотя и трудоемких методов. Вторичную, третичную и четвертичную структуры исследовать весьма нелегко. В настоящее время единственным методом определения всей пространственной структуры белка является рентгеноструктурный анализ белковых кристаллов. Даже тогда, когда установлены координаты каждого атома в молекуле, как это сделано для миоглобина и лизоцима, остается еще далеко не ясным, какими специфическими силами взаимодействия определяются эти координаты. Мы можем, однако, установить, какие аминокислотные остатки располагаются в области активного центра, химическим путем — исследуя, как влияет модификация таких остатков на «связывание» субстратов и конкурентных ингибиторов или на каталитическую активность фермента.

При изучении ферментативного катализа следует проводить четкое разграничение между влиянием среды на каталитические группы в активном центре и ее влиянием на сохранность активной конформации фермента. Нередко есть возможность решить, чему именно следует приписать изменение активности фермента, вызванное воздействием среды, — значительному нарушению конформации белка или же изменению химического строения активного центра. Химическая модификация специфических остатков в белке может вести к инактивации фермента либо вследствие разрушения активного центра, либо вследствие того, что активный центр в химически модифицированном белке становится недоступным для субстрата (фиг. 64).

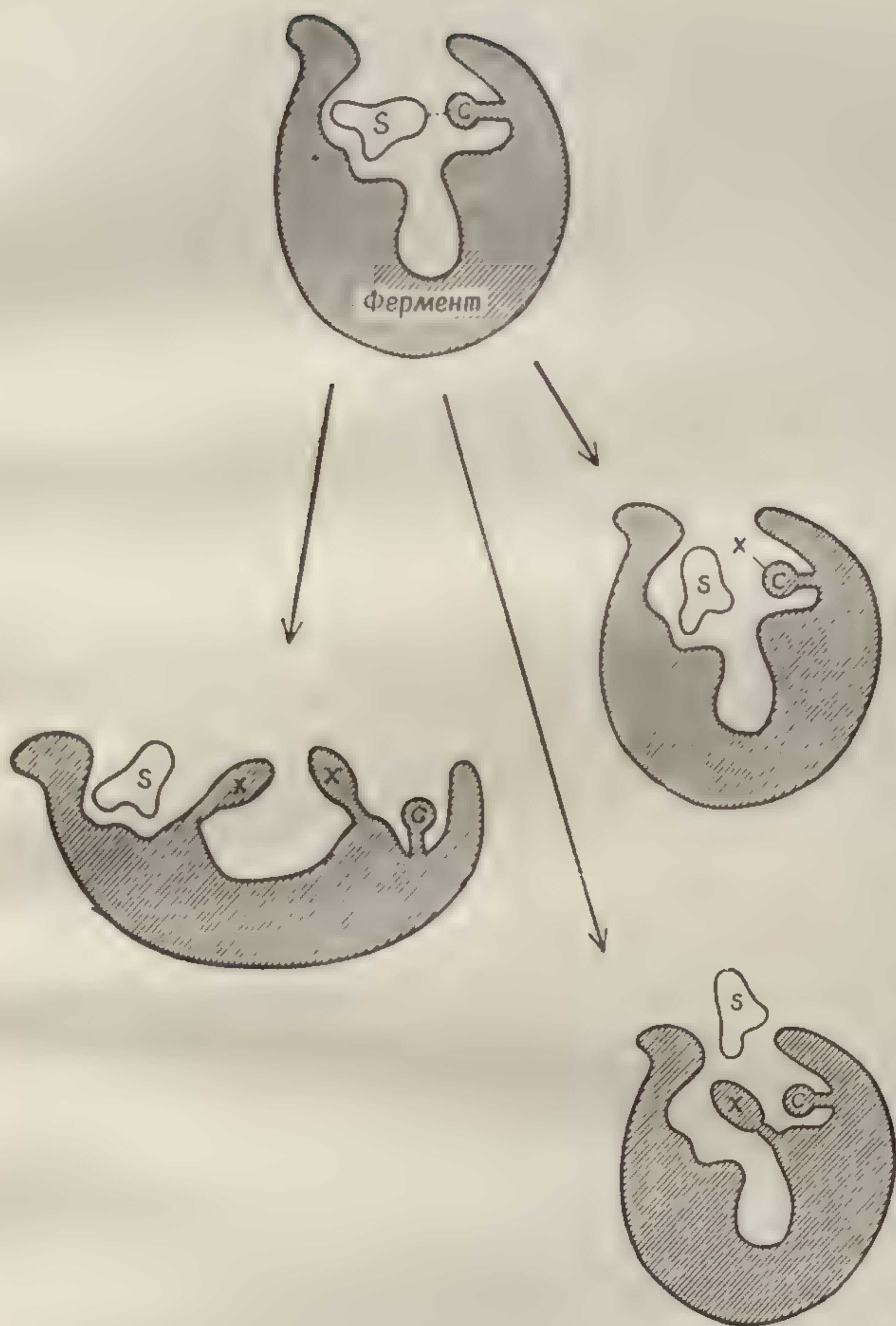
Во многих случаях удается модифицировать определенные участки в молекуле белка без значительного изменения его макроструктуры. Интересный пример представляет собой оксигенация групп гема в гемоглобине, которая изменяет взаимное расположение полипептидных субъединиц, но при этом лишь незначительно влияет на общую трехмерную структуру каждой отдельной субъединицы.

В том случае, когда структурные изменения выражены сильно и охватывают значительную часть белковой молекулы, говорят о *денатурации* белка.



Фиг. 64. Различные  
избирате  
X — модифицирующая ре





Ф и г. 64. Различные модели инактивации фермента в результате избирательной химической модификации.  
 X — модифицирующий реагент; C — каталитически активная группировка фермента; S — субстрат.



## 5. ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ

Специфическая активная конформация ферментного белка определяется многими взаимодействиями (гл. III). Если окружающая среда изменяется таким образом, что некоторые из этих взаимодействий ослабевают (или совсем исчезают), то структура фермента в значительной степени нарушается, что связано с кооперативной природой взаимодействий. Вполне вероятно, что активные конформации многих ферментов устойчивы лишь относительно. Иными словами, при небольшом изменении суммарной свободной энергии взаимодействия (обусловленном утратой некоторых специфических взаимодействий) активная конформация перестает быть наиболее благоприятной (устойчивой) и начинается разрушение структуры.

Переход от *упорядоченной* конформации к *неупорядоченной* обычно и называют *денатурацией*. Сомнительно, однако, чтобы в денатурированном состоянии структура белков была всегда полностью неупорядоченной. Поэтому точно определить понятие денатурации затруднительно. Если же подразумевать под денатурацией просто значительное изменение конформации полипептида, то качественно его легко отличить от тех небольших конформационных изменений (заглатывающих только часть молекулы), о которых мы говорили в предыдущем разделе. Денатурация обычно сопровождается значительными изменениями некоторых физических свойств белка, в частности его оптической активности, вязкости и ультрафиолетового спектра. Нативные ферментные белки имеют весьма компактную структуру; в этой структуре остатки с неполярными боковыми цепями, взаимодействующие посредством дисперсионных сил, запряты внутри молекулы, а сильно полярные или заряженные остатки обращены наружу, в водный раствор. Если полипептидная цепь теряет упорядоченную структуру, то молекула становится значительно более вытянутой и существенно менее жесткой; водный растворитель получает при этом доступ к неполярным боковым цепям.

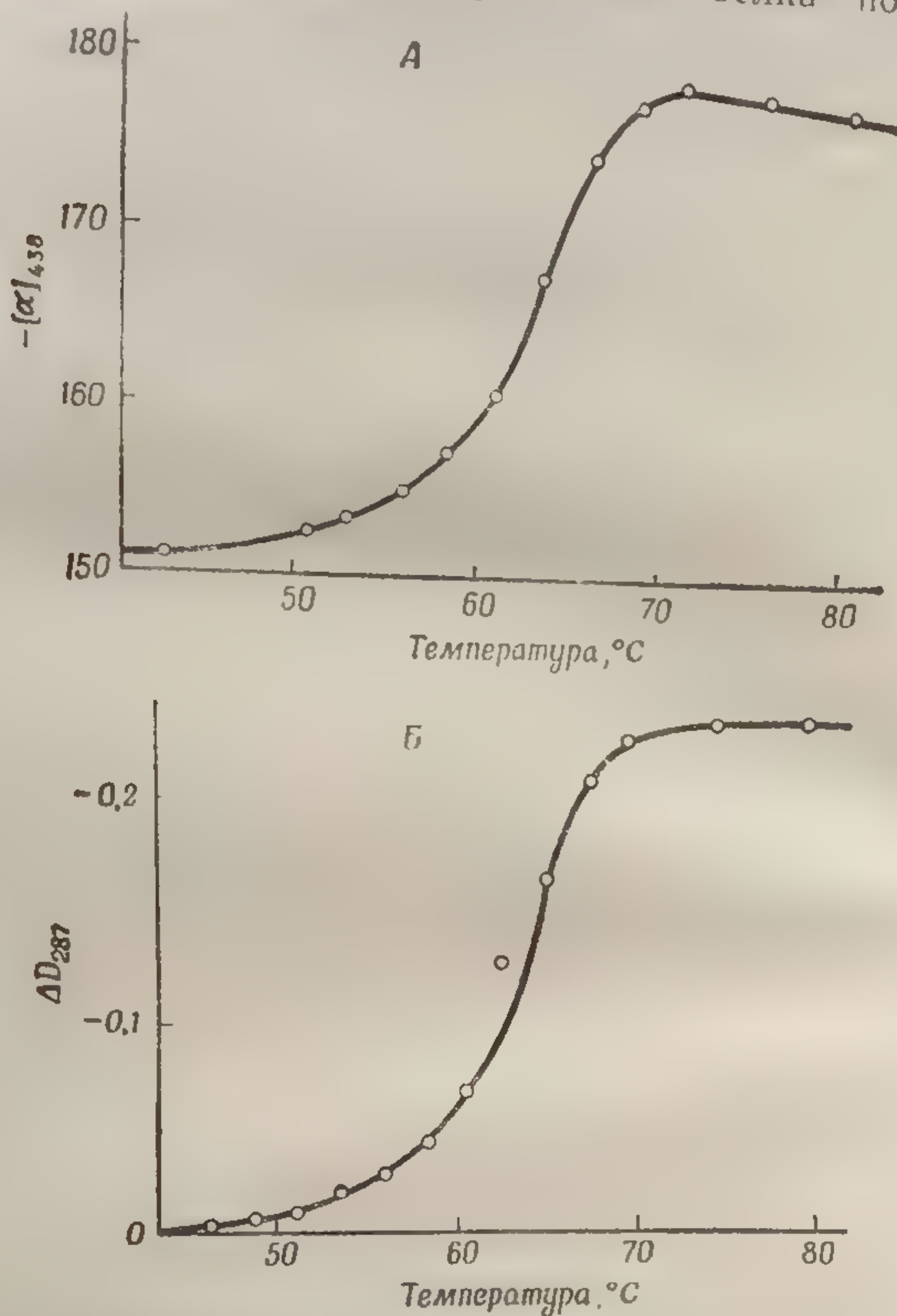


При переходе от упорядоченного состояния к неупорядоченному изменяется ориентация соседних заместителей по отношению к асимметрическим  $\alpha$ -углеродным атомам аминокислотных остатков и вследствие этого изменяется суммарное оптическое вращение, свойственное данному белку. Следует различать такое общее изменение ориентации заместителей, сопровождающее любой переход порядок—беспорядок, и более специфическое изменение, которое имеет место при переходе от  $\alpha$ -спирали к хаотическому клубку (гл. III). При таком переходе изменяется кривая *дисперсии оптического вращения* (т. е. зависимости величины вращения от длины волны поляризованного монохроматического света), характерная для спиральной конформации цепи. В случае упорядоченной, но неспирализованной белковой структуры характеристическая дисперсия оптического вращения, связанная со спиральной конформацией, отсутствует и кривая вращательной дисперсии подобна той, которая свойственна хаотическому клубку. Таким образом, переход от упорядоченной (но неспирализованной) структуры к неупорядоченной будет сопровождаться изменением суммарного оптического вращения, но кривая дисперсии оптического вращения при этом не изменится (такая ситуация наблюдается, в частности, для двух ферментов — рибонуклеазы и химотрипсина (гл. VIII), у которых, как полагают, доля спиральной структуры очень незначительна).

Аминокислоты тирозин и триптофан содержат хромофоры, сильно поглощающие в ультрафиолете ( $\sim 280$  мкм); поглощение белка в этой области обусловлено главным образом вкладом этих двух хромофоров. Характеристические спектры хромофоров зависят от полярности окружающего растворителя. Когда эти гидрофобные остатки запряты внутри белковой молекулы, они недоступны для растворителя; в этом случае спектры характеризуют полярность их внутреннего окружения в белковой глобуле. У ферментов с нативной структурой эти спектры оказываются удивительно постоянными, что свидетельствует о сходстве внутренней среды в различных белках. В полипептидной цепи, утратившей упорядоченную структуру, ароматические



хромофоры взаимодействуют с водным растворителем и поэтому спектры денатурированного белка подобны



Фиг. 65. Оптическое вращение в растворе рибонуклеазы при рН 6,83 (А) и оптическая плотность этого раствора при 287 мкм (Б) как функции температуры (J. Hermans, Jr., and H. A. Scheraga, J. Am. Chem. Soc., 83; 3283, 1961).

тем, которые наблюдаются в водных растворах малых молекул, содержащих те же хромофорные группы. Таким образом, денатурация сопровождается довольно

большинство в  
ненными в  
иллюстриру  
оптической  
фиг. 65 и 6  
Денатур  
различным  
следующие

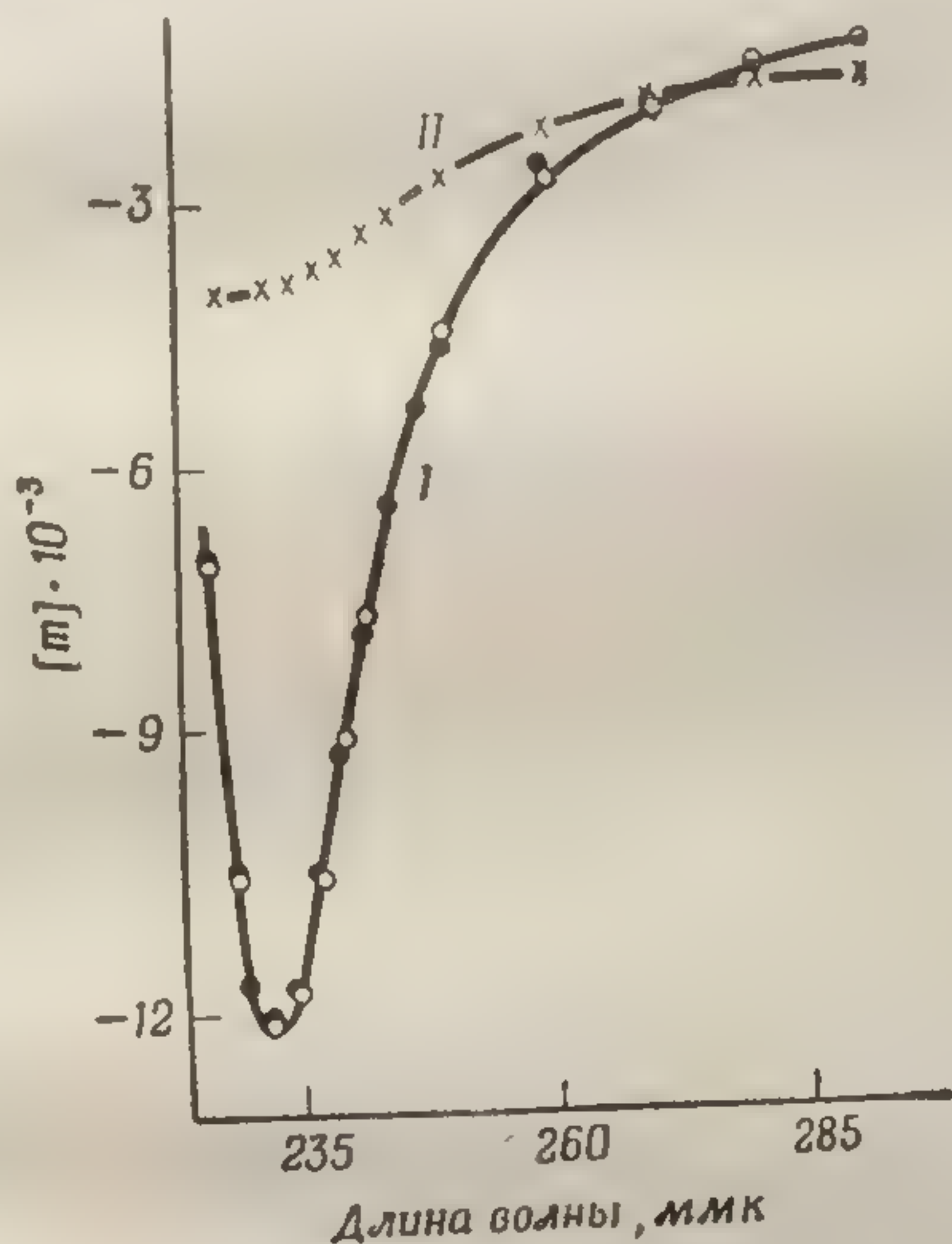
Фиг. 66. Д  
бина (I) и

1. Пере  
склонность  
мер в кон  
нидина ил  
2. Пере  
например  
тели (суда  
твор моче  
натурирую



большими и легко измеряемыми спектральными изменениями в области 270—290 мк. Типичные кривые, иллюстрирующие изменения оптического вращения и оптической плотности при денатурации, приведены на фиг. 65 и 66.

Денатурация белков может быть вызвана самыми различными изменениями окружающей среды. Типичны следующие случаи:



Фиг. 66. Дисперсия оптического вращения для нативного миоглобина (I) и для миоглобина в 3 М солянокислом гуанидине (II).

1. Перенос белка в растворитель с выраженной склонностью к образованию водородных связей, например в концентрированный раствор солянокислого гуанидина или мочевины.

2. Перенос белка из воды в менее полярную среду, например в смешанные водно-органические растворители (сюда относится и концентрированный водный раствор мочевины). Мочевина может действовать как денатурирующий агент двумя путями, а именно разрывая



водородные связи и нарушая гидрофобные неполярные взаимодействия.

3. Изменение температуры. Если температура повышается настолько, что разрываются некоторые водородные или гидрофобные связи, то наступают резкие структурные переходы (см., например, фиг. 21, 65 и 66).

4. Добавление детергентов. При добавлении в раствор органических молекул, которые содержат как гидрофобный неполярный участок, так и сильно полярную группу (детергенты), гидрофобные боковые цепи белка могут быть выведены к поверхности контакта с растворителем; это происходит вследствие их сильного взаимодействия с гидрофобным участком молекулы детергента, полярный участок которой связан сильным взаимодействием с водным растворителем. В результате молекула белка раскрывается и нарушается упорядоченность ее структуры.

5. Изменение ионного состава среды. В компактной упорядоченной структуре большинство заряженных остатков располагается на поверхности белка в контакте с растворителем. Если среди них преобладает один какой-нибудь тип заряженных групп (например,  $\text{NH}_3^+$  или  $\text{COO}^-$ ), то стабильность белковой молекулы может существенно зависеть от ионной силы водной среды. При очень низкой солевой концентрации отталкивание между одноименными зарядами будет дестабилизировать компактную структуру и приводить к образованию более растянутой неупорядоченной структуры. Заметно влиять на стабильность структуры белка могут также определенные ионы, способные образовывать комплексы с отдельными боковыми цепями.

6. Изменение pH. Общий (положительный или отрицательный) заряд белка определяется значением pH среды. Для аспарагиновой и глутаминовой кислот, лизина, гистидина, а также концевых карбоксильных и аминных групп полипептидной цепи величины  $pK$ , в водных растворах лежат в пределах, всего лишь на несколько единиц отклоняющихся от нейтрального значения pH. При тех значениях pH, при которых общий положительный или отрицательный заряд белка велик, кулоновские силы отталкивания могут дестабилизиро-

вать ком  
большин  
узкой зо  
зоне).  
pH < 5,0.  
Интер

редко ок  
соответс  
мер, риб  
и химотр  
менты, со  
субстрат  
выми по  
гих случа  
ствующим

рическим  
гл. IV) в  
страта ил  
ному уча  
уменьшат

лизация  
в присутс  
нятной, е  
ции. Обла  
компактно  
ваться и  
пами фер

«открытая  
участком

более скло  
ной приро  
туры в обл

дуть к  
В присутс

тура этого  
исчезает «

Дестабили  
ческих фе  
субстрата  
субъединиц



вать компактную белковую структуру. Действительно, большинство белков стабильно только в относительно узкой зоне рН (обычно, но не всегда в нейтральной зоне). Примером белка, стабильного только при  $\text{pH} < 5,0$ , служит пепсин.

Интересно отметить, что присутствие субстрата нередко оказывает существенное влияние на стабильность соответствующего фермента. Многие ферменты (например, рибонуклеаза, протеолитические ферменты трипсин и химотрипсин, НАД-зависимые дегидрогеназы и ферменты, содержащие пиридоксальфосфат) в присутствии субстрата или кофермента оказываются более устойчивыми по отношению к денатурирующим агентам. В других случаях (особенно это относится к ферментам, участвующим в метаболическом контроле, т. е. к аллостерическим ферментам, о которых шла речь в разд. 5 гл. IV) в присутствии молекулы аллостерического субстрата или аналога, который связывается по субстратному участку, структурная стабильность белка может уменьшаться, т. е. облегчается его денатурация. Стабилизация упорядоченной нативной структуры фермента в присутствии субстрата или кофермента становится понятной, если учесть компактность белковой конформации. Область активного центра не может быть вполне компактной, ибо при этом субстрат не мог бы связываться и взаимодействовать с каталитическими группами фермента. Вполне возможно поэтому, что именно «открытая» структура активного центра является тем участком молекулы ферментного белка, который наиболее склонен к разворачиванию. Благодаря кооперативной природе процесса денатурации разворачивание структуры в области активного центра должно быстро приводить к разворачиванию всей молекулы в целом. В присутствии стереоспецифического субстрата структура этого участка более уже не остается открытой, т. е. исчезает «отправная точка» денатурационного перехода. Дестабилизацию белка субстратом в случае аллостерических ферментов объясняют тем, что под влиянием субстрата ослабляется взаимодействие полипептидных субъединиц белка, т. е. структура агрегата разрых-



ляется, а в таком виде она должна быть более подвержена денатурации.

Много внимания уделялось вопросу о том, можно ли считать активную конформацию фермента в условиях «физиологической» среды термодинамически наиболее стабильной. Ряд данных в пользу того, что эта конформация действительно термодинамически наиболее стабильна, был получен при исследовании обратимости процесса денатурации, главным образом на таком хорошо охарактеризованном ферменте как рибонуклеаза (подробно о нем см. в гл. VIII). Особо вескими доводами можно считать следующие: 1) во многих случаях денатурация ферментов (особенно денатурация под действием мочевины) легко обратима; 2) восстановление четырех дисульфидных связей рибонуклеазы ( $RS-SR \rightarrow 2RSH$ ) приводит к разворачиванию полипептидной цепи; последующее окисление ( $2RSH \rightarrow RS-SR$ ) в растворителях, в которых нативная структура фермента стабильна, приводит к замыканию исходных четырех дисульфидных связей с образованием активного фермента, имеющего нативную конфигурацию.

Нередко, однако, оказывается, что денатурированный белок трудно ренатурировать (хотя и не исключено, что денатурация сопровождалась изменением ковалентных связей). Имеются также ферментные белки, которые в отличие от рибонуклеазы не содержат дисульфидных связей, способствующих стабилизации строго упорядоченной структуры. Весьма часто в любых условиях эксперимента *скорость* ренатурации денатурированного белка бывает очень мала. В то же время известно, что синтез новых белковых молекул из аминокислот *in vivo* — по большей части очень быстрый процесс. Это дает основание полагать, что независимо от того, является или нет нативная конформация фермента термодинамически наиболее стабильной, эта нативная конформация должна возникать в процессе синтеза белка. Можно представить себе, например, что полипептидная цепь складывается постепенно, по мере того как она синтезируется, и что формирование конечной конформации завершается к концу синтеза. Если при денатурации синтезированная полипептидная цепь развер-

тывается,  
скольким  
допустим  
будет обр  
возникне  
чески на

в. В  
АМИ

На ос  
мической  
смотрим  
нокислот  
располага  
рых можн  
цию. Мног  
шихся да  
остатков  
разделах  
рим некот

Один о  
уже давн  
фермента,  
Речь идет  
основных  
рН, можн  
фермента  
определен  
проведены  
чали кинет

Вл

Активно  
ние рН на  
ставлено о  
на фиг. 67  
толитическ



тывается, то вновь свернуться она может, очевидно, несколькими разными способами. Тогда приходится допустить, что надлежащая активная структура либо будет образовываться очень медленно, либо вообще не возникнет, если только она не является термодинамически наиболее стабильной.

#### 6. ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ОПРЕДЕЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

На основании данных о влиянии избирательной химической модификации на активность ферментов рассмотрим вопрос о роли боковых цепей отдельных аминокислот в различных каталитических механизмах. Мы располагаем теперь рядом реагентов, с помощью которых можно проводить такую избирательную модификацию. Многие из них были синтезированы с учетом имевшихся данных о возможном значении определенных остатков для каталитического процесса. В следующих разделах данной главы, а также в гл. VIII мы рассмотрим некоторые из этих веществ.

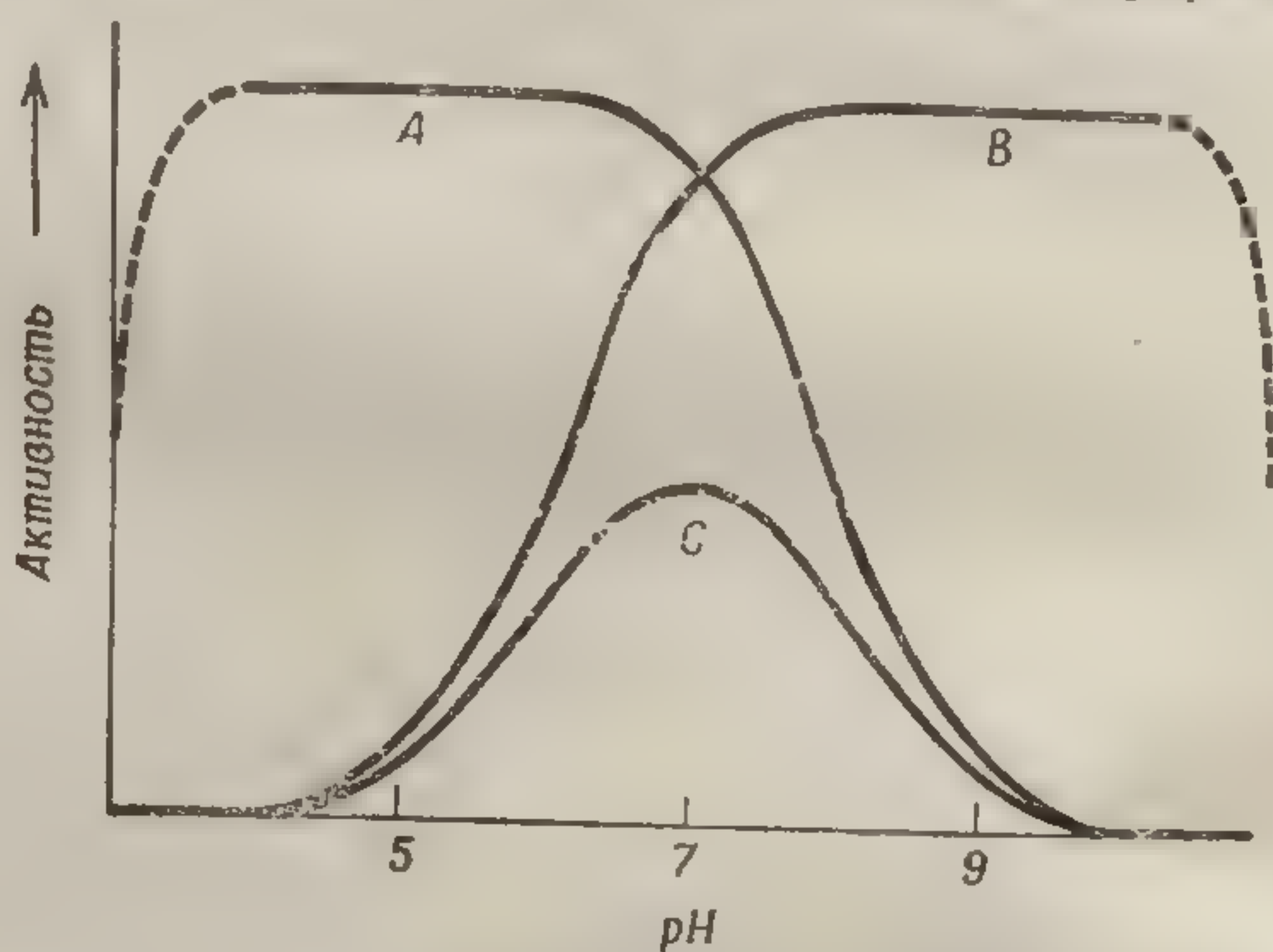
Один особый вид модификации, оказывающий, как уже давно известно, сильное влияние на активность фермента, заслуживает специального рассмотрения. Речь идет о процессе обратимого протонирования слабословных остатков. Изменяя и тщательно контролируя pH, можно проследить за тем, как влияет на активность фермента протонирование индивидуальных остатков или определенных типов остатков. Подобные исследования проведены почти со всеми ферментами, у которых изучали кинетику действия.

#### Влияние pH на активность ферментов

Активность каждого фермента зависит от pH. Влияние pH на активность фермента часто может быть представлено одним из двух типов графиков, приведенных на фиг. 67 (если приняты во внимание константы протолитической диссоциации самого субстрата). Эти два



типа графиков, описывающих зависимость активности от pH, обычно называют колоколообразным и сигмоидальным. Следует учесть, что в обоих случаях активность выражается через максимальную скорость реакции (т. е. скорость в условиях насыщения субстратом). Это весьма существенно, так как очень часто само связывание субстрата с активным центром фермента за-



Фиг. 67. Типичные кривые зависимости активности фермента от pH среды.

Падение активности при крайних значениях pH (обозначено пунктирной линией) обусловлено денатурацией белка. Зона pH, в которой происходит денатурация, характерна для определенной белковой структуры; поэтому у разных ферментов она может быть различной.

висит от pH либо вследствие некоторого изменения конформации активного центра под влиянием pH среды (разд. I гл. VIII), либо вследствие изменения заряда ферментного белка. Последний фактор играет, конечно, более важную роль в случае субстратов, которые сами заряжены. При крайних значениях pH часто происходит денатурация фермента. Поэтому необходимо соблюдать осторожность, чтобы не принять падение активности, обусловленное денатурацией фермента, за обратимое протонирование определенных основных остатков. Если принята во внимание возможность обратимой или необратимой денатурации при крайних значениях pH, то влияние pH на активность фермента часто можно ис-

В  
ментал  
делью  
(Типич  
стант  
экспер  
сопостав  
пряжен  
ков, ко

Конста

Кисл

-CO<sub>2</sub>H

-CO<sub>2</sub>H

-CO<sub>2</sub>H

-Имид

-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>

-SH

-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>

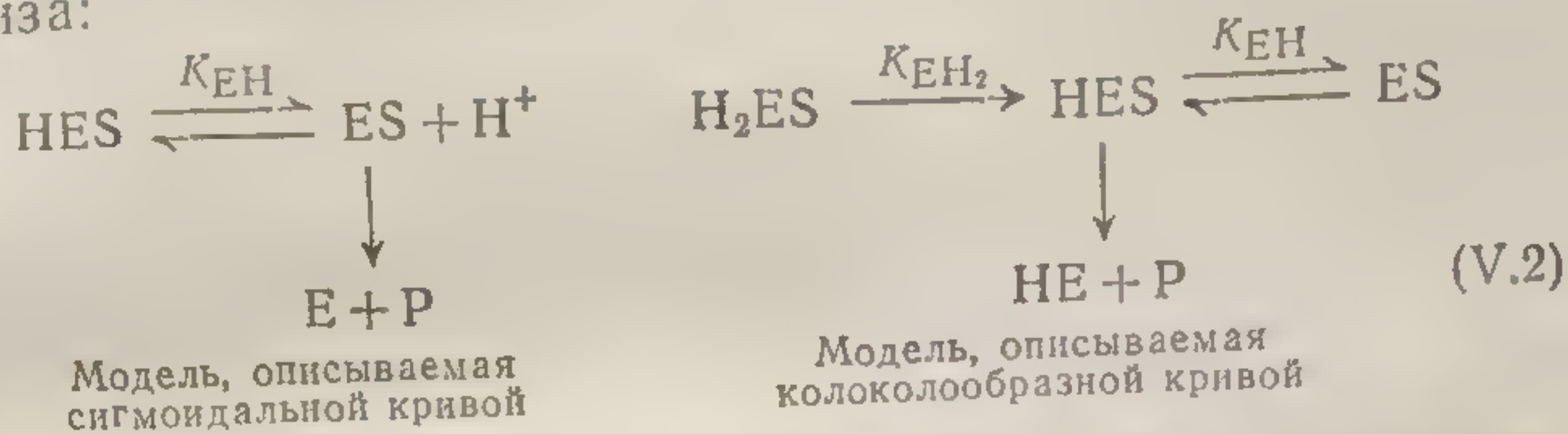
О

При

При  
личие д  
риваемо  
станту



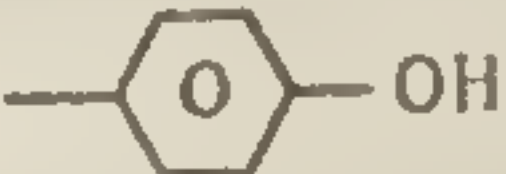
толковать, основываясь на одной из двух моделей катализа:



В процессе проверки соответствия между экспериментально найденной зависимостью и теоретической моделью определяют константы диссоциации  $K_{\text{EH}}$  и т. д. (Типичные графики для различных значений этих констант диссоциации приведены на фиг. 67.) Найденные экспериментально константы диссоциации можно затем сопоставить с известными константами диссоциации сопряженных кислотных форм тех аминокислотных остатков, которые приведены в табл. 13.

Таблица 13

Константы диссоциации слабокислых аминокислотных остатков в пептидной цепи

Кислотная группа	Остаток	$pK_a$ <sup>1)</sup>
$-\text{CO}_2\text{H}$	Концевая карбоксильная группа	2,1—2,4
$-\text{CO}_2\text{H}$	Аспартат	3,7—4,0
$-\text{CO}_2\text{H}$	Глутамат	4,2—4,5
$-\text{Имидазоль}^+$	Гистидин	6,7—7,1
$-\text{NH}_3^+$	Концевая аминогруппа	7,6—8,0
$-\text{SH}$	Цистеин	8,8—9,1
$-\text{NH}_3^+$	Лизин	9,3—9,5
	Тирозин	9,7—10,1

<sup>1)</sup> При отсутствии других зарядов по соседству с рассматриваемой группой.

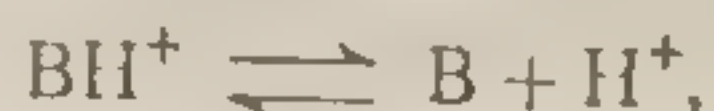
При этом необходимо иметь в виду следующее: 1) наличие других фиксированных зарядов вблизи рассматриваемого диссоциирующего остатка влияет на его константу диссоциации (фиксированные катионы всегда



повышают ее, а фиксированные анионы, напротив, понижают); 2) полярность среды влияет на диссоциацию типа



т. е. на такую, при которой нейтральная кислотная группа диссоциирует на две заряженные частицы — катион и анион (диссоциация положительно заряженных кислот, протекающая по типу



относительно мало зависит от полярности растворителя). Второй из названных факторов не играет существенной роли, если водный растворитель имеет свободный доступ к активному центру. Кроме того, любое изменение константы диссоциации, обусловленное действием этого фактора, можно учесть, исследовав дополнительно влияние рН на активность фермента в условиях, когда концентрация субстрата ниже оптимальной, поскольку в данном случае связывание субстрата должно влиять на определяемую константу диссоциации. Роль первого фактора (наличие фиксированного заряда в области активного центра) выявляется при использовании субстратов со сходной структурой, но различных по заряду. Когда влияние рН на активность можно связать с функционированием немногих слабо-диссоциирующих групп, природу соответствующих остатков удастся установить с помощью химических методов, которые будут описаны ниже.

Интересно отметить, что для самых разнообразных ферментов были получены значения  $pK_a$ , лежащие в пределах 4—9. В этом интервале рН единственными диссоциирующими группами фермента (если он не имеет кофермента) являются карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, концевая  $\alpha$ -карбоксильная группа, имидазольное кольцо гистидина, тиоловая группа цистеина и N-концевая  $\alpha$ -аминогруппа (фенольный гидроксил тирозина и  $\epsilon$ -аминогруппа лизина диссоциируют за пределами этого интервала). Чаще всего на основании изучения зависимости между скоростью ферментативных реакций и рН среды возникает предполо-



жение о том, что в действии фермента участвует имидазол гистидина, сопряженная кислотная форма которого имеет  $pK_a$  около 7.

Более детально роль кислот и оснований в ферментативном катализе обсуждается в следующей главе.

С целью идентификации боковых цепей аминокислот, участвующих в каталитической активности, многие исследователи избирательно модифицировали химическими методами боковые цепи ферментного белка и выясняли, как влияет такая модификация на каталитическую активность. Если она приводит к инактивации (или к понижению активности), то требуется выяснить, происходит ли это в результате разрушения каталитического участка активного центра, в результате изменения конформации активного центра (что должно создавать пространственные затруднения для взаимодействия с субстратом) или, наконец, в результате изменения трехмерной структуры фермента. Исследование каталитической активности при высоких концентрациях субстрата во многих случаях помогает решить вопрос о том, изменилось ли сродство к субстрату или же снизилась каталитическая активность. Часто применяют описанные выше оптические методы для прослеживания значительных изменений в общей конформации белка.

Для модификации боковых цепей аминокислот обычно используют реакции трех типов, к рассмотрению которых мы теперь и перейдем.

#### Реакции избирательного модифицирования, основанные на работах с модельными пептидами

В опытах с синтетическими пептидами или другими аналогами нередко удается подобрать такие условия, при которых химическому модифицированию подвергается лишь один из 20 типов аминокислотных остатков или в крайнем случае небольшое их число. Подобной же обработке подвергают и нативный фермент. Скорость химического модифицирования остатков соответствующего типа варьирует в зависимости от положения данного остатка в белковой макромолекуле. Так, боковая цепь, запрятанная внутри молекулы белка, реагирует



гораздо медленнее, чем такая же цепь, направленная в сторону водного растворителя. Есть достаточно оснований считать, что если какие-либо остатки в нативном ферменте реагируют со скоростью, близкой к той, которая наблюдается в случае модельных пептидов, то эти остатки в нативной белковой структуре доступны для водного растворителя. Следовательно, даже когда остатки определенного типа много раз встречаются в полипептидной цепи, часто удается, тщательно контролируя степень протекания реакции, модифицировать избирательно лишь один или немногие из этих остатков. Поскольку область активного центра должна быть доступной для водной среды, неудивительно, что остатки, участвующие в каталитическом акте, нередко модифицируются раньше, чем другие остатки того же типа.

Химические реагенты часто взаимодействуют более чем с одним из 20 различных типов боковых цепей аминокислот. Однако в специально подобранных условиях реакция может протекать избирательно, затрагивая только один из типов боковых цепей. Хорошим примером этого служит реакция алкилирования иодацетамидом [уравнение (V.3)]. Этот реагент взаимодействует с эффективными донорами электронов, например с сульфгидрильной группой цистеина, тиоэфирной группой метионина, азотом имидазольного кольца гистидина и ε-аминогруппой лизина. Реакция с метионином практически не зависит от pH, поскольку между реагентом и протонами растворителя отсутствует конкуренция за электронную пару атома серы. Тот же реагент эффективно атакуется электронной парой (основного) азота (или меркаптидного аниона) только в таких условиях, когда конкуренция между реагентом и протонами раствора незначительна, т. е. при значениях pH, равных или превышающих  $pK_a$  сопряженной кислоты:



При отсутствии стерических препятствий скорость реакции алкилирования зависит от электронодонорной способности соответствующего атома. Это свойство часто коррелирует со степенью основности. Для двух



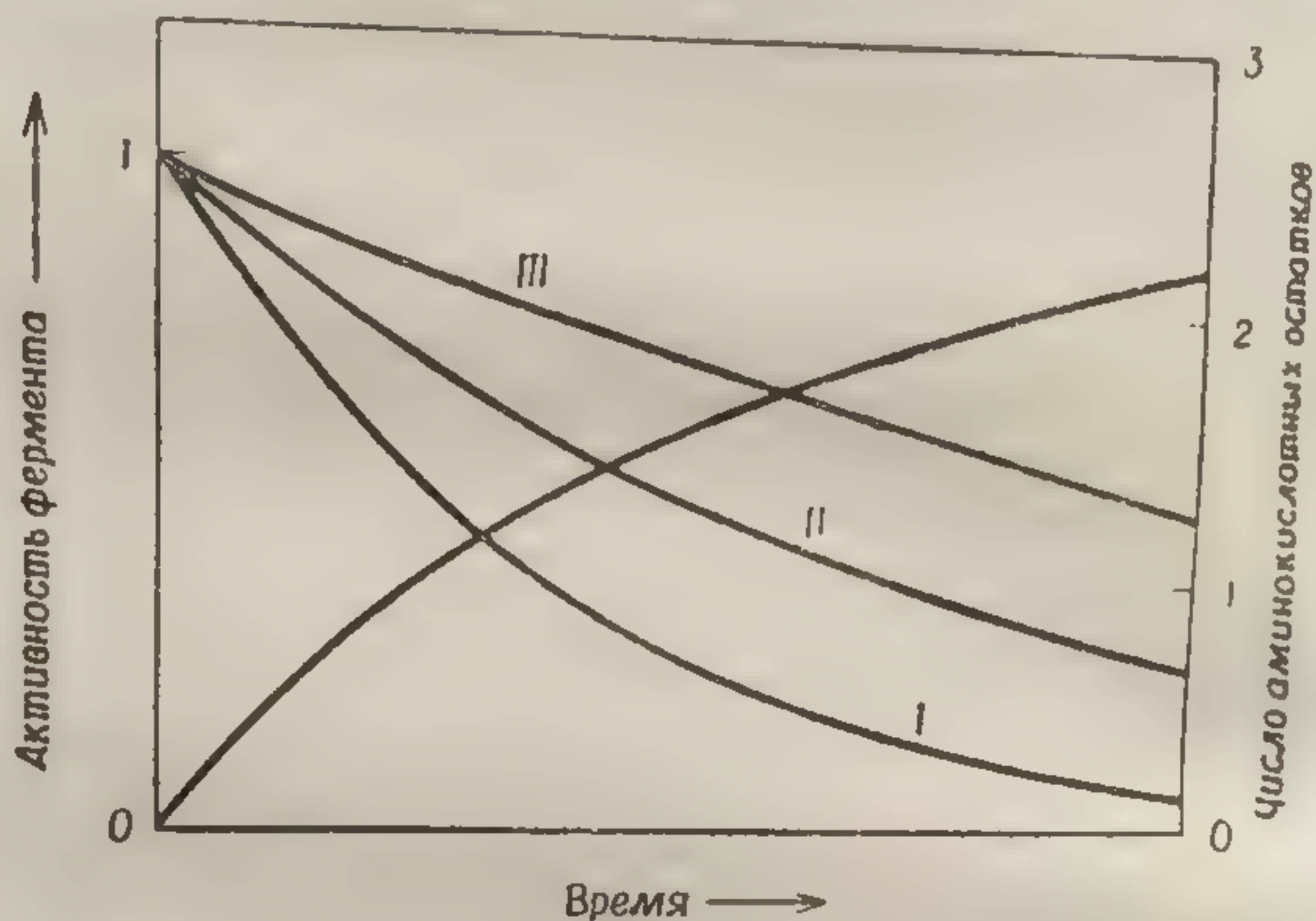
азотистых оснований — гистидина и лизина — относительные скорости реакции с ацетамидом должны коррелировать со значениями  $pK_a$  сопряженных кислотных форм (табл. 13), поскольку связывание протона также зависит от электронодонорной способности основания. Помимо этого, скорости реакции будут зависеть от того, какая доля основания находится в непротонированной форме. В отсутствие цистеина, который реагирует наиболее быстро, реакции можно придать относительную избирательность в отношении метионина, гистидина или лизина, установив надлежащий pH раствора. В гл. VIII мы обсудим применение моноиодуксусной кислоты для избирательного модифицирования аминокислотных остатков в молекулах рибонуклеазы и  $\alpha$ -химотрипсина, которые не содержат цистеина.

Участие определенного остатка в каталитическом акте можно распознать с помощью эксперимента следующего типа. Если аминокислотный состав данного ферментного белка известен, то за ходом реакции модификации можно следить, определяя как изменяется во времени общее число аминокислотных остатков рассматриваемого типа. Одновременно регистрируют активность фермента. Таким путем удастся установить связь между блокированием определенного остатка и изменением каталитической активности, т. е. получить данные в пользу того, что этот остаток участвует либо в каталитическом механизме, либо в связывании субстрата.

Нередко остатки, от которых зависит каталитическая активность, гораздо более реакционноспособны, чем остатки того же типа, не участвующие в катализе. Однако в ряде случаев остаток, существенный для катализа, модифицируется только на более поздних стадиях реакции. При этом наблюдается более медленное снижение ферментативной активности в ходе реакции модификации (фиг. 68). Если получены результаты подобного рода, то остаток, который участвует в катализе, нередко может быть выявлен путем повторения обработки с использованием радиоактивной метки или аналогичного, но химически отличного реагента *после* того, как не существенные для активности одноименные



остатки будут модифицированы. Вслед за такой обработкой проводят гидролиз ферментного белка до пептидных фрагментов, как описано раньше; пептидный фрагмент, содержащий радиоактивную метку, удается обычно выделить, после чего можно бывает определить последовательность аминокислот в области активного центра.



Фиг. 68. Типичные кривые зависимости активности фермента от числа химически модифицированных аминокислотных остатков определенного типа.

Справа по оси ординат отложено число модифицированных аминокислотных остатков из расчета на молекулу фермента. I — каталитически активен первый модифицируемый участок; II — каталитически активен второй модифицируемый участок; III — каталитически активен третий модифицируемый участок.

Рассмотренный в данном разделе способ химического модифицирования широко использовался при выяснении значения остатков метионина, цистеина, гистидина и лизина для каталитической активности ферментов.

#### Избирательное введение метки в аминокислотные остатки активного центра посредством реакций с аналогами субстратов

После того как та или иная ферментативная реакция в какой-то мере изучена, для нее может быть предложен определенный механизм (например, ацилфер-

ментный механизм. Из этого, удаётся при реакции с ко- ние фермент—ан- промежуточному мент-субстратной жет оказаться ст- конформационно- ферментом (а э- реакции), либо каталитического наблюдается у- ложительно по- а- пользования либо- гентов (например- эфиров), либо фо- нения по своей- стратами (в суш- гораздо более ре- страты), но у ни- фичность к како- образуют с акти- тастабильные пр- ные продукты. к которой прис- быть идентифици- фрагмента, содер- активную метку. центр широко и- катализирующих групп. В том сл- ного соединения иногда выделить- ции. Ацил- или- ции фермента о- ральных значени- Если исследу- фермент—субстр- соответствующей- пытаться уловит- трой модификаци-

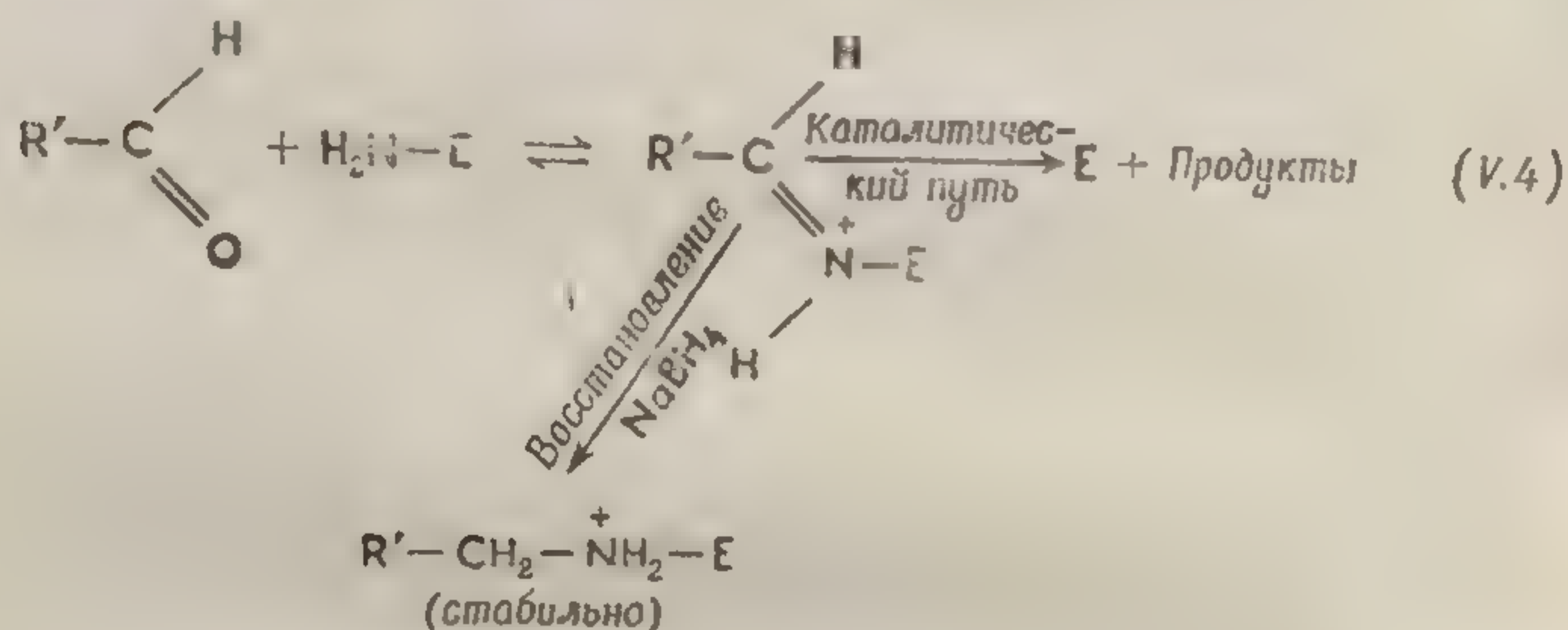


ментный механизм обсуждавшийся в гл. IV). Исходя из этого, удастся иногда подобрать аналог субстрата, при реакции с которым образуется стабильное соединение фермент—аналог, соответствующее гипотетическому промежуточному продукту, возникающему в ходе фермент-субстратной реакции. Соединение с аналогом может оказаться стабильным либо вследствие отсутствия конформационного соответствия между аналогом и ферментом (а это означает замедление последующей реакции), либо в результате химического изменения каталитического аппарата. Стабилизация первого типа наблюдается у ферментов, функционирующих предположительно по ацилферментному механизму, при использовании либо неспецифических ацилирующих реагентов (например, ацилимидазолов и нитрофениловых эфиров), либо фосфорилирующих реагентов. Эти соединения по своей реакционной способности сходны с субстратами (в сущности, в химическом отношении они гораздо более реакционноспособны, чем типичные субстраты), но у них отсутствует конформационная специфичность к какому-либо определенному ферменту. Они образуют с активными центрами многих ферментов метастабильные промежуточные соединения или стабильные продукты. Реакционноспособная боковая цепь, к которой присоединился подобный реагент, может быть идентифицирована путем выделения пептидного фрагмента, содержащего либо химическую, либо радиоактивную метку. Этот прием введения метки в активный центр широко использовался при изучении ферментов, катализирующих перенос ацильных или фосфорильных групп. В том случае, когда стабильность промежуточного соединения фермент—аналог невелика, его удастся иногда выделить, денатурировав фермент в ходе реакции. Ацил- или фосфорилпроизводные после денатурации фермента оказываются стабильными в зоне нейтральных значений pH.

Если исследуемый комплекс фермент—аналог (или фермент—субстрат) распадается с высокой скоростью, соответствующей числу оборотов фермента, то можно попытаться уловить промежуточное соединение путем быстрой модификации каталитических центров, участвующих



в последующих стадиях реакции. Хорошим примером этого служат фермент-субстратные реакции, проходящие через промежуточную стадию шиффова основания (подробнее об этом см. в гл. VIII):



Промежуточные соединения этого рода весьма реакционноспособны; при наличии в активном центре соответствующих каталитических групп они могут превращаться в различные продукты. В условиях, при которых эти промежуточные соединения вовлекаются в другую, быстро протекающую реакцию, они могут быть превращены в стабильные соединения, не способные к дальнейшим ферментативным превращениям. Шиффовы основания легко стабилизируются в результате реакции с сильным восстановителем — боргидридом натрия; при этом они переходят в очень стойкие аминопроизводные [уравнение (V.4)]. Модифицированную боковую цепь и последовательность соседних аминокислот можно определить обычными методами. Этот путь широко использовался для доказательства того, что в ферментативном катализе участвуют определенные остатки лизина.

#### Избирательное введение метки в активный центр с помощью стереоспецифических реагентов

В отличие от только что рассмотренного метода, основанного на присутствии химически сходных структур в субстрате и его аналоге, в данном методе используется сродство фермента к определенной конфигурации субстрата; это позволяет ввести метку в определенный

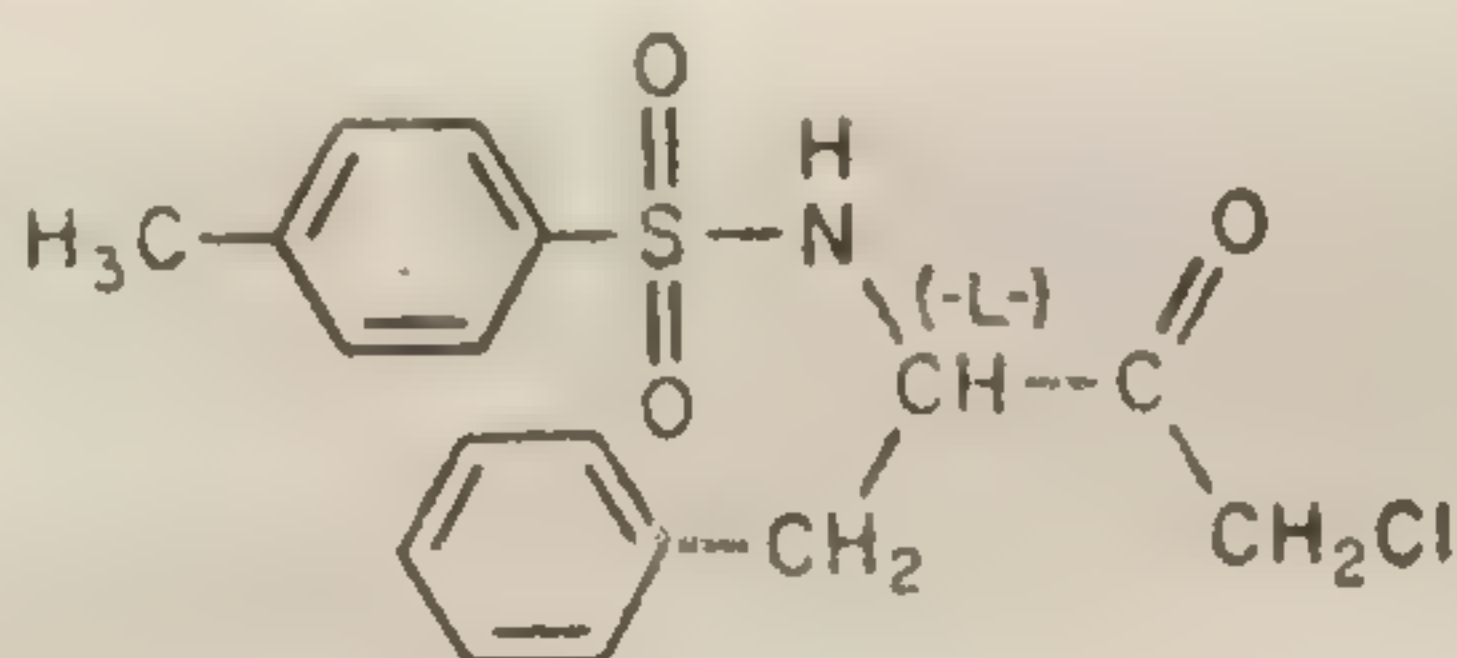
функциональ-  
со связанны  
синтез моле-  
тивного кат-  
способный  
ковалентно  
нокислотны  
реагентом  
ного центр  
ции с тем  
которого р  
гента. Особ  
зирванный  
нилхлормет

Молеку-  
специфиче-  
она содер-  
связывани  
происходи  
выступать  
вытеснять  
ция алкил  
ствии дан  
приводит  
Реакция п  
моль α-хим  
руется ли  
в одном

При эт  
пошаго раз



функциональный остаток, расположенный по соседству со связанным субстратом. В общем виде метод включает синтез молекулы, стереоспецифической в отношении активного центра<sup>1</sup> и содержащей химически реакционно-способный центр, который может вступать в стабильное ковалентное соединение с одним или несколькими аминокислотными остатками. Высокое сродство между таким реагентом и субстратсвязывающим участком активного центра значительно увеличивает вероятность реакции с тем или иным подходящим остатком, вблизи которого располагается реакционноспособный центр реагента. Особенно интересен в этом смысле реагент, синтезированный Шеллманом и Шоу, N-тозил-L-фенилаланилхлорметилкетон (ТФХК).



N-тозил-L-фенилаланилхлорметилкетон

Молекула ТФХК имеет ту же конфигурацию, что и специфические субстраты  $\alpha$ -химотрипсина. Кроме того, она содержит *алкилирующий центр* ( $-\text{CH}_2\text{Cl}$ ). После связывания этого соединения в активном центре может происходить алкилирование любой группы, способной выступать в качестве донора электронной пары (т. е. вытеснять хлорид-ион). Было показано, что такая реакция алкилирования действительно происходит при действии данного реагента на  $\alpha$ -химотрипсин и что она приводит к полной потере каталитической активности. Реакция протекает стехиометрически (1 моль ТФХК на моль  $\alpha$ -химотрипсина). Установлено также, что алкилируется лишь один из двух атомов азота имидазола в одном из двух гистидиновых остатков фермента.

<sup>1</sup> При этом исходят из данных о специфичности фермента в отношении различных субстратов и (или) конкурентных ингибиторов.



## Избирательное введение метки в каталитические группы

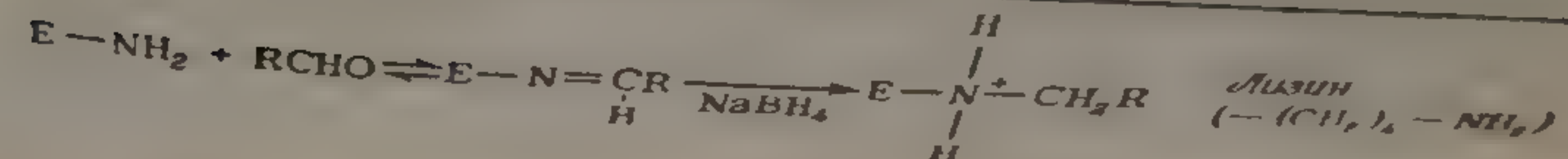
Фермент	Модифицирующий агент	Химическая реакция	Модифицируемый аминокислотный остаток
Панкреатические протеазы млекопитающих (химотрипсин, трипсин, тромбин, эластаза) Эстеразы (холинэстераза, печеночная эстераза) Бактериальные протеазы (субтилизин)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ [(\text{CH}_3)_2\text{CHO}]_2\text{P}-\text{F} \\ \text{R} \end{array}$	$\text{R}_2-\text{P}-\text{F} + \text{EON} \rightarrow \text{R}_2-\text{P}-\text{OE} + \text{HF}$	Серин ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ )
Химотрипсин, субтилизин	Паранитрофенилацетат Ацетилимидазол $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}-\text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{N} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{N} \end{array}$	$\text{R}-\text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{X} \end{array} + \text{EON} \rightarrow \text{R}-\text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OE} \end{array} \xrightarrow{\text{Денатурация}} + \text{HX}$	Серин
Фосфоглюкомутаза	Глюкозо-6-фосфат	$\text{RORON} + \text{EON} \rightarrow \text{EORON} \xrightarrow{\text{Денатурация}} + \text{RON}$	Серин
Щелочная фосфатаза	$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	$\text{HORON} + \text{EON} \rightarrow \text{EORON} \xrightarrow{\text{Денатурация}} + \text{H}_2\text{O}$	Серин
Фосфорилиза, Глутамат-аспартат- трансаминаза	Пиридоксальфосфат	$\text{E}-\text{NH}_2 + \text{RCHO} \rightleftharpoons \text{E}-\text{N}=\text{CH}-\text{R} \xrightarrow{\text{NaBH}_4} \text{E}-\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2\text{R}$	Лизин ( $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ )

Ацетоацетатдекарбоксилаза	Ацетоацетат	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2^- + \text{E} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2^- \xrightarrow{\text{HNE}^-} \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}_2^- + \text{CO}_2 \\ \text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCO}_2^- \xrightarrow{\text{NaBH}_4} \text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CO}_2^- \xrightarrow{\text{H}_2\text{NE}^+} \text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{NH}_2\text{E} \end{array}$	Лизин
Альдолаза	Ацетальдегид	$\text{CH}_3\text{C}(\text{H})=\text{O} + \text{E} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{C}(\text{H})=\text{NE} \xrightarrow{\text{NaBH}_4} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2\text{E}$	Лизин
Глицеральдегидфосфат- дегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа	$\text{ICH}_2\text{CO}_2^-$	$\text{ICH}_2\text{CO}_2^- + \text{ESH} \rightarrow \text{ES}-\text{CH}_2\text{CO}_2^-$	Цистеин ( $-\text{CH}_2\text{SH}$ )
Глицеральдегидфосфат- дегидрогеназа, паладин	$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$	$\text{ESH} + \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \rightarrow \text{ES}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3 + \text{Нитрофенол} \xrightarrow{\text{Денатурация}}$	Цистеин
Химотрипсин, трипсин	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{SO}_2\text{NHCHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \\ \text{R} \end{array}$	$\text{R}'-\text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_2\text{Cl} \end{array} + \text{E}-\text{N} \begin{array}{c} \text{H} \\ \parallel \\ \text{N} \end{array} \begin{array}{c} \text{H} \\ \parallel \\ \text{N} \end{array} \rightarrow \text{E}-\text{N} \begin{array}{c} \text{H} \\ \parallel \\ \text{N} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_2\text{CR}' \end{array} + \text{HCl}$	Гистидин









**АУСУН**

**ЛУЗНИ**

Цистеин  
( $-\text{CH}_2\text{SH}$ )

Цустеуи

## Густидия



Использование ТФХК оказалось в данном случае особенно успешным, поскольку удалось показать, что каталитическая активность связана именно с боковой цепью того остатка гистидина, который подвергается модифицированию. Но если бы даже модифицированный остаток не был необходим для катализа, то и тогда опыт показал бы, что он локализован вблизи активного центра. Эта специфическая реакция рассматривается более подробно там, где речь идет о механизме действия  $\alpha$ -химотрипсина (разд. 1 гл. VIII). Интересно отметить, что остаток гистидина, модифицируемый при этой реакции алкилирования, отстоит примерно на 140 аминокислотных звеньев от специфически реакционноспособного остатка серина (обнаруженного методом субстратных аналогов). Ряд других ферментов также был модифицирован при помощи стереоспецифических реагентов, главным образом алкилирующих.

Мы рассмотрели в общих чертах методы, применяемые в настоящее время для идентификации каталитических групп в ферментах. Ряд наиболее важных результатов таких опытов суммирован в табл. 14. Вследствие различий в аминокислотных последовательностях конформации разных белков весьма разнообразны. Естественно поэтому, что были предложены также и другие приемы химической модификации с учетом особенностей отдельных ферментов. Подробное рассмотрение таких приемов не входит, однако, в задачу данной книги. Часть их упоминается в гл. VIII при обсуждении механизмов некоторых ферментативных реакций. Всякий раз, когда удастся установить, что та или иная боковая цепь участвует в каталитическом акте (или влияет на него), открываются возможности для более плодотворного обсуждения деталей каталитического механизма.

## ЛИТЕРАТУРА

- Thompson E. V. P., The Insulin Molecule, Scientific American, May 1955.  
Stein W. H., Moore S., The Chemical Structure of Proteins, Scientific American, February 1961.  
Stein W. H., Moore S., Chromatography, Scientific American, March 1951.

Sanger F., The S...  
Research, D. E. C...  
Kopple K. D., Pept...  
W. A. Benjamin, ...  
Koshland D., The ...  
mol, 22, 45 (196...  
Goodwin J., Harr...  
Enzymes, Acade...  
Laursen R. A., We...  
tate Decarboxyla...



- Sanger F., The Structure of Insulin, in Currents in Biochemical Research, D. E. Green (ed.), Interscience, New York, 1956.
- Kopple K. D., Peptides and Amino Acids, Chapter 4 and Appendix, W. A. Benjamin, New York, 1966.
- Koshland D., The Active Site and Enzyme Action, Adv. in Enzymol., 22, 45 (1960).
- Goodwin J., Harris I., Hartley B., Structure and Activity of Enzymes, Academic Press, London, 1964.
- Laursen R. A., Westheimer F. H., The Active Site of Acetoacetate Decarboxylase, J. Am. Chem. Soc., 88, 3426 (1966).



## ГЛАВА VI

### СХЕМЫ МЕХАНИЗМОВ И МОДЕЛИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Ферменты катализируют значительную часть реакций, в которые вступают соединения углерода, водорода, кислорода, азота, фосфора и серы. В одной небольшой главе невозможно, конечно, охватить все разнообразие химических механизмов, участвующих в биосинтетических и катаболических процессах. Однако некоторые общие характерные особенности ферментативного катализа нуждаются в кратком рассмотрении. Ознакомившись с ними, мы сможем затем — хоть и не слишком подробно, но все же достаточно основательно — обсудить механизмы ферментативного катализа. Ниже мы остановимся на четырех таких характерных особенностях ферментативных реакций:

1. *Скорости ферментативных реакций («числа оборотов» ферментов) варьируют в не очень широких пределах, несмотря на большое разнообразие типов химических превращений.* Реакции, катализируемые ферментами, можно разделить на два класса: 1) реакции, сводящиеся к переносу электронов, и 2) реакции, сопровождающиеся переносом как электронов, так и протонов. Второй класс реакций значительно обширнее первого. В оптимальных условиях числа оборотов для реакций второго класса составляют примерно  $10^3$  молекул субстрата на молекулу фермента в секунду (у большинства ферментов этого класса числа оборотов отличаются от этой средней величины не более чем на порядок). Реакции первого класса катализируются ферментами, имеющими значительно большие числа оборотов ( $\sim 10^8 \text{ сек}^{-1}$ ).

2. *Белки-ферменты осуществляют катализ при посредстве ограниченного числа различных функциональ-*

Схемы кет...  
ных групп. Инерт  
фенилаланина. Тес  
не участвуют в м  
которых других  
глутамат, аспара  
ким образом, чи  
рых может стро  
ограниченно. Изв  
тическом акте не  
гистидина, серин  
можно, что в ка  
также и некоторы  
Имеются, напри  
талитической фун  
и аспартата.

3. *Зависимость*  
рН характеризует  
мов. В большинс  
лежит вблизи ней

4. *Нативные м*  
сравнению со сво  
продуктов частич  
разу не удалось  
значительно укор  
ладает каталитич  
тивностью интак  
величины).

Перед обсужд  
тивных реакций  
характерные тип  
сов. В основу о  
катализатора, а  
терпевающей хим

1. *НУКЛЕОФИЛ*

Функциональ  
стью быть донор  
филом. Если в х  
тор предоставляет



ных групп. Инертные боковые цепи глицина, аланина, фенилаланина, лейцина, валина, изолейцина и пролина не участвуют в химическом катализе. Боковые цепи некоторых других аминокислот очень сходны (аспартат и глутамат, аспарагин и глутамин, треонин и серин). Таким образом, число химических «элементов», из которых может строиться каталитический центр, весьма ограничено. Известно, что у ряда ферментов в каталитическом акте непосредственно участвуют боковые цепи гистидина, серина, цистеина и лизина. Вполне возможно, что в каталитический акт могут вовлекаться также и некоторые другие аминокислотные остатки. Имеются, например, данные, свидетельствующие о каталитической функции карбоксильных групп глутамата и аспартата.

3. *Зависимость скорости ферментативных реакций от pH характеризуется наличием оптимумов или максимумов.* В большинстве случаев оптимум или максимум лежит вблизи нейтральной зоны ( $pH\ 7 \pm 2$ ).

4. *Нативные молекулы ферментов очень велики по сравнению со своими субстратами.* При исследовании продуктов частичного гидролиза ферментных белков ни разу не удалось убедительно показать, что какой-либо значительно укороченный полипептидный фрагмент обладает каталитической активностью, сравнимой с активностью интактного фермента (хотя бы по порядку величины).

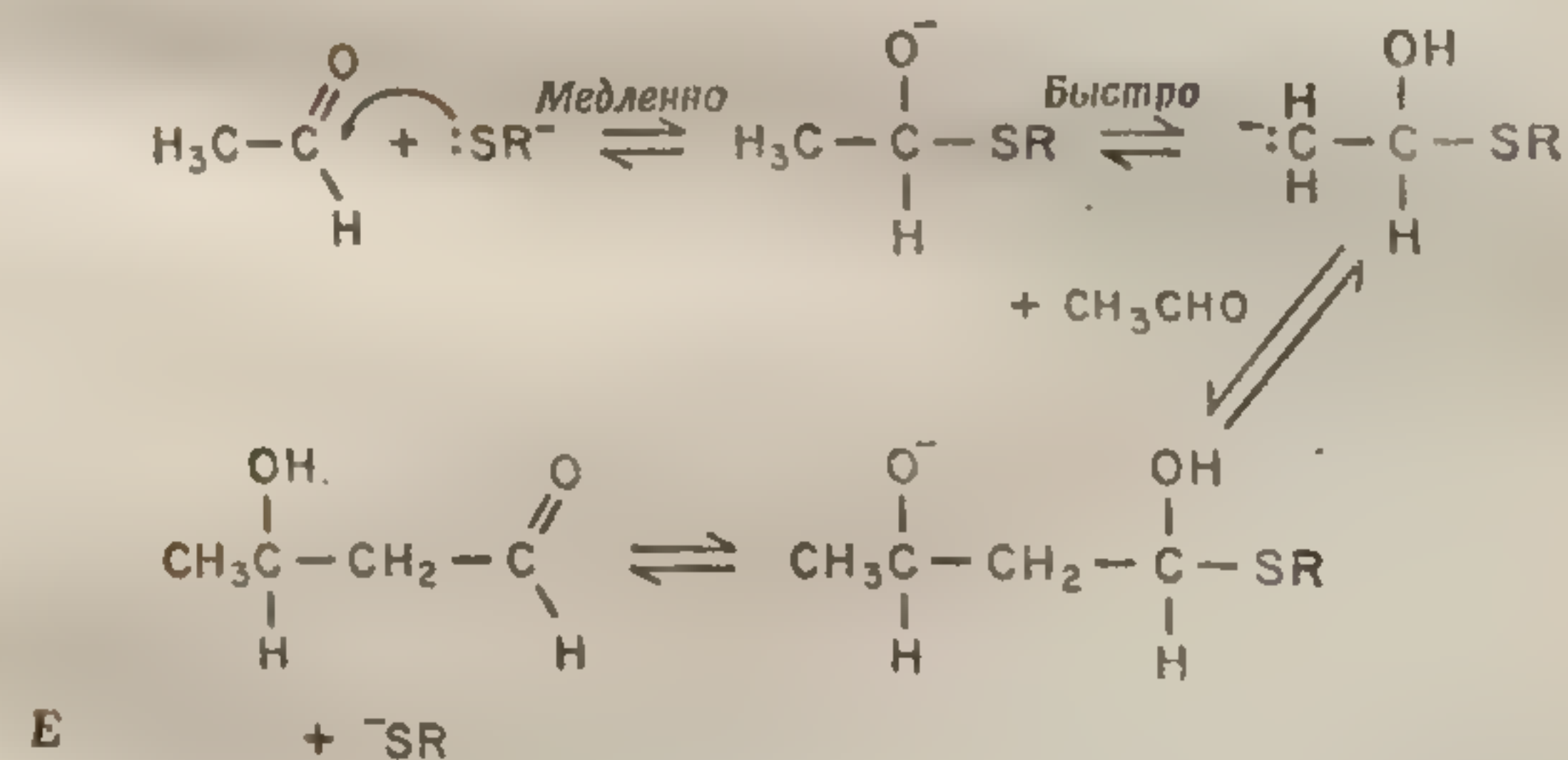
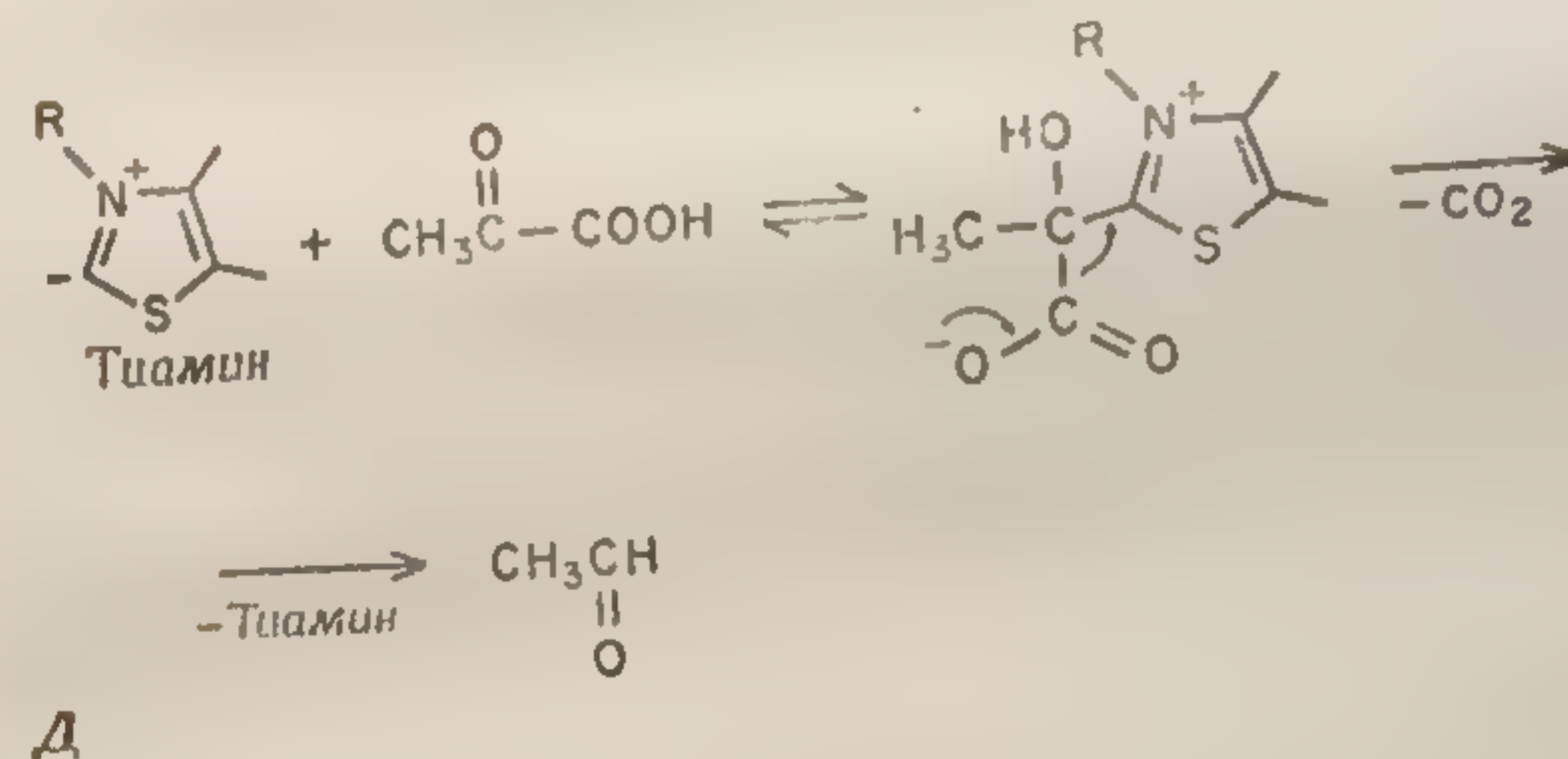
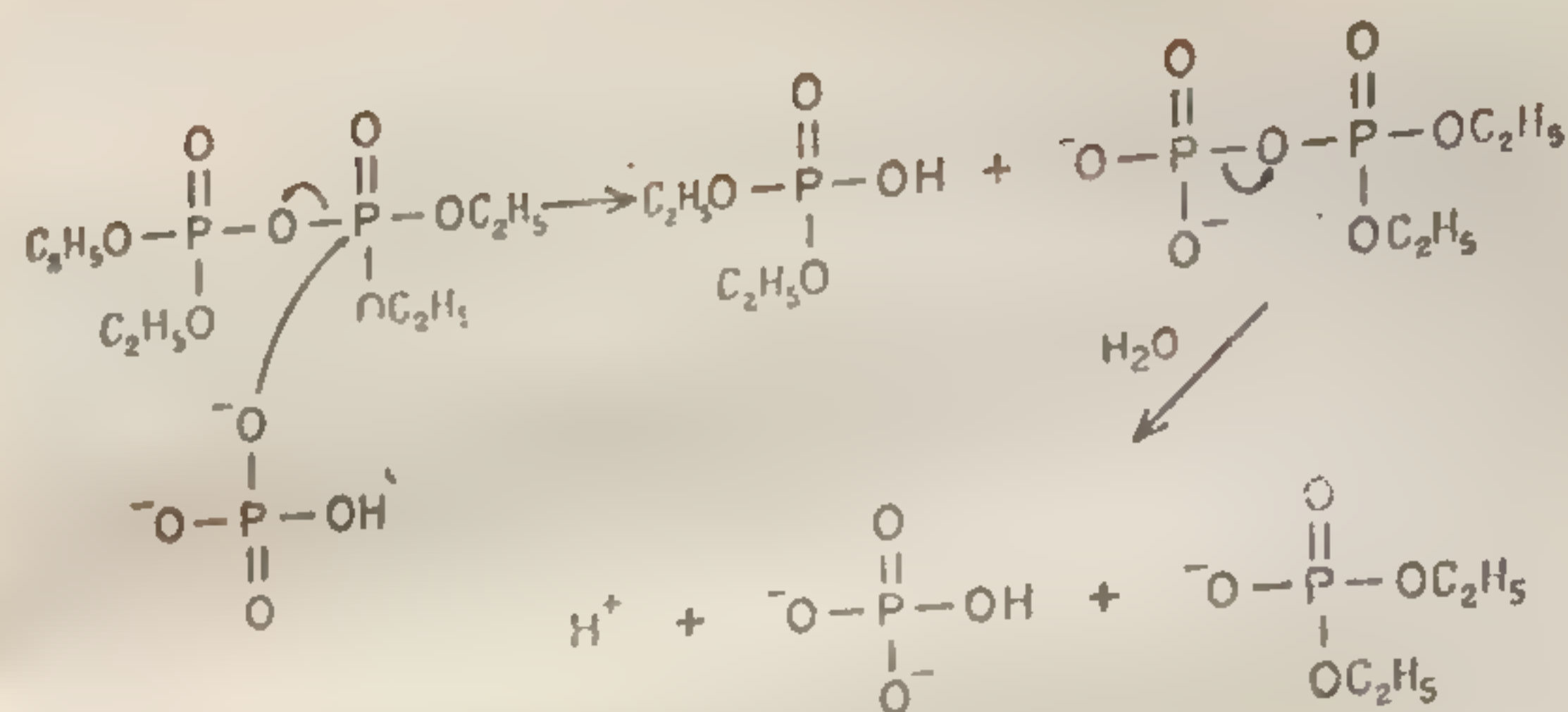
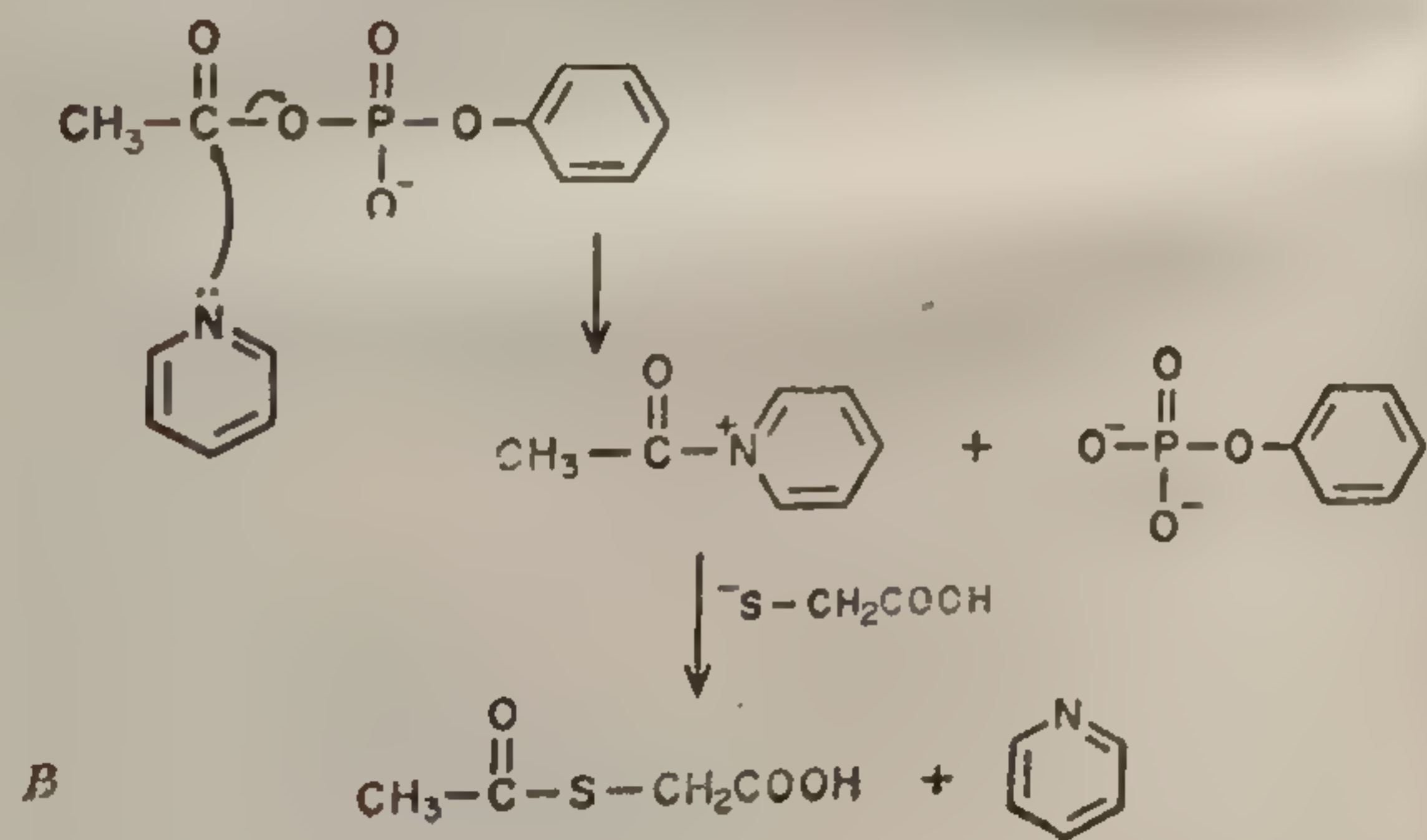
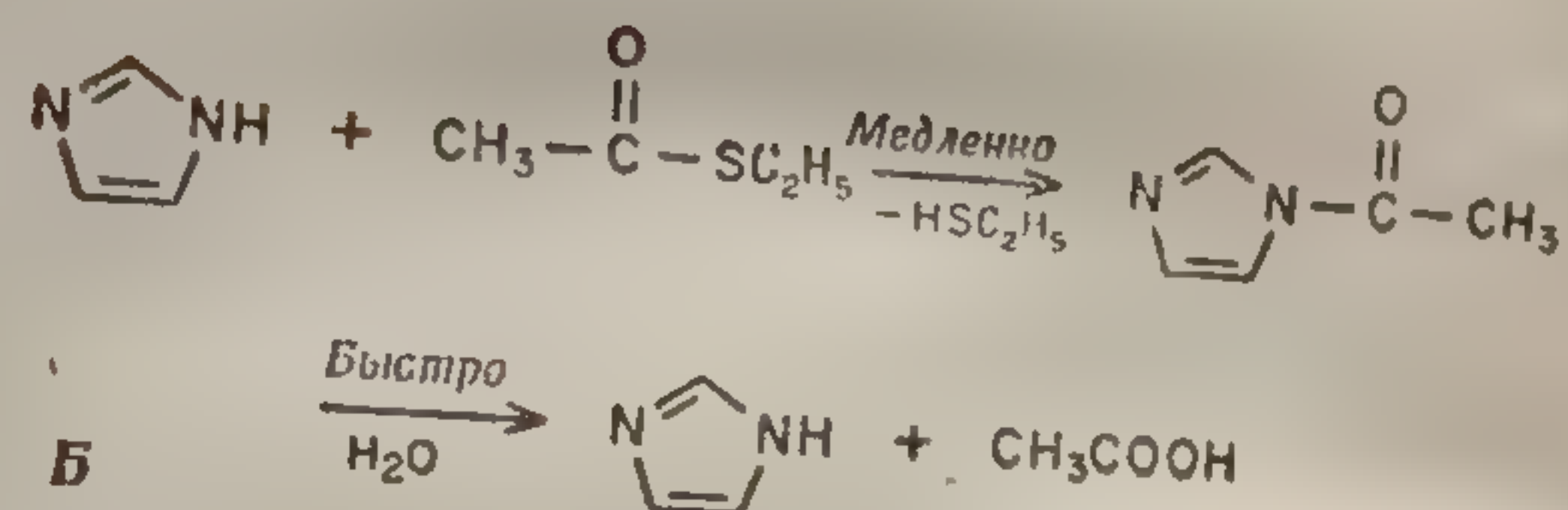
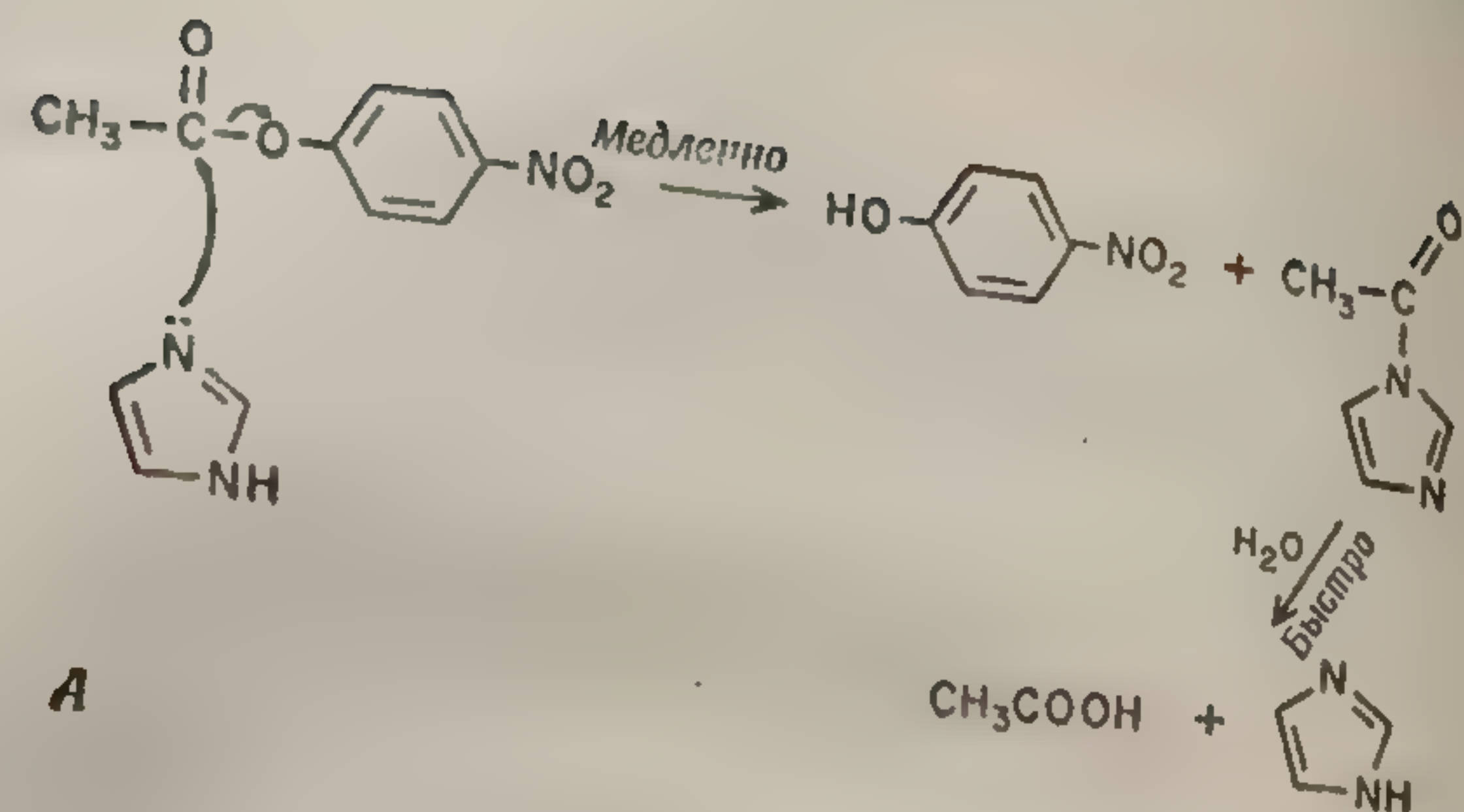
Перед обсуждением вопроса о механизме ферментативных реакций целесообразно рассмотреть некоторые характерные типы каталитических химических процессов. В основу определения этих типов положена роль катализатора, а не природа молекулы субстрата, претерпевающей химическое превращение.

## 1. НУКЛЕОФИЛЬНЫЙ И ЭЛЕКТРОФИЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ

### Нуклеофильный катализ

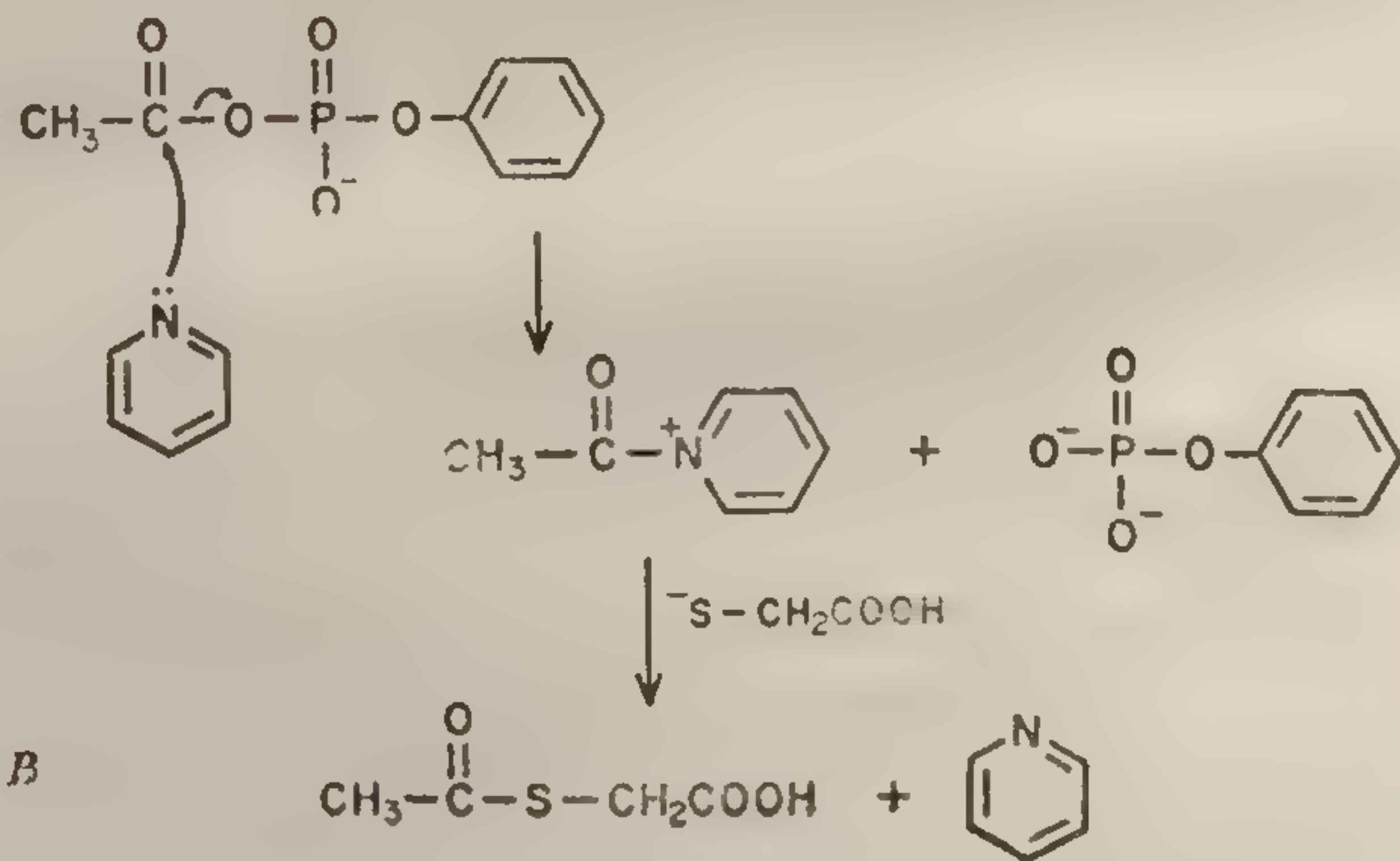
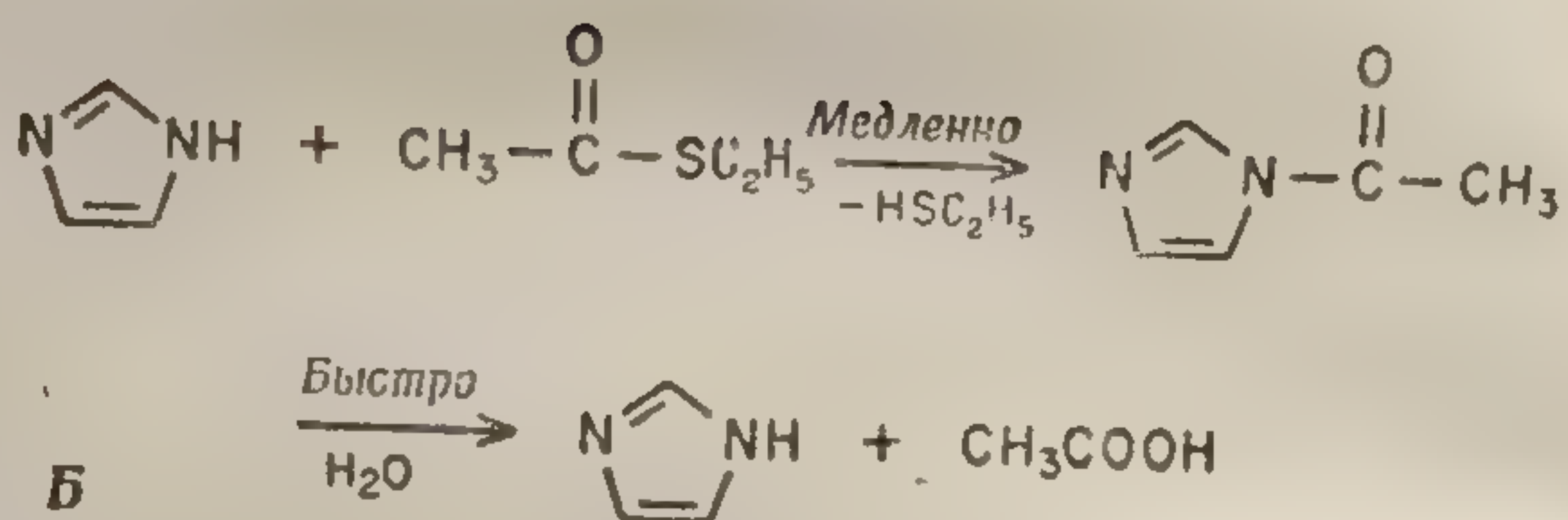
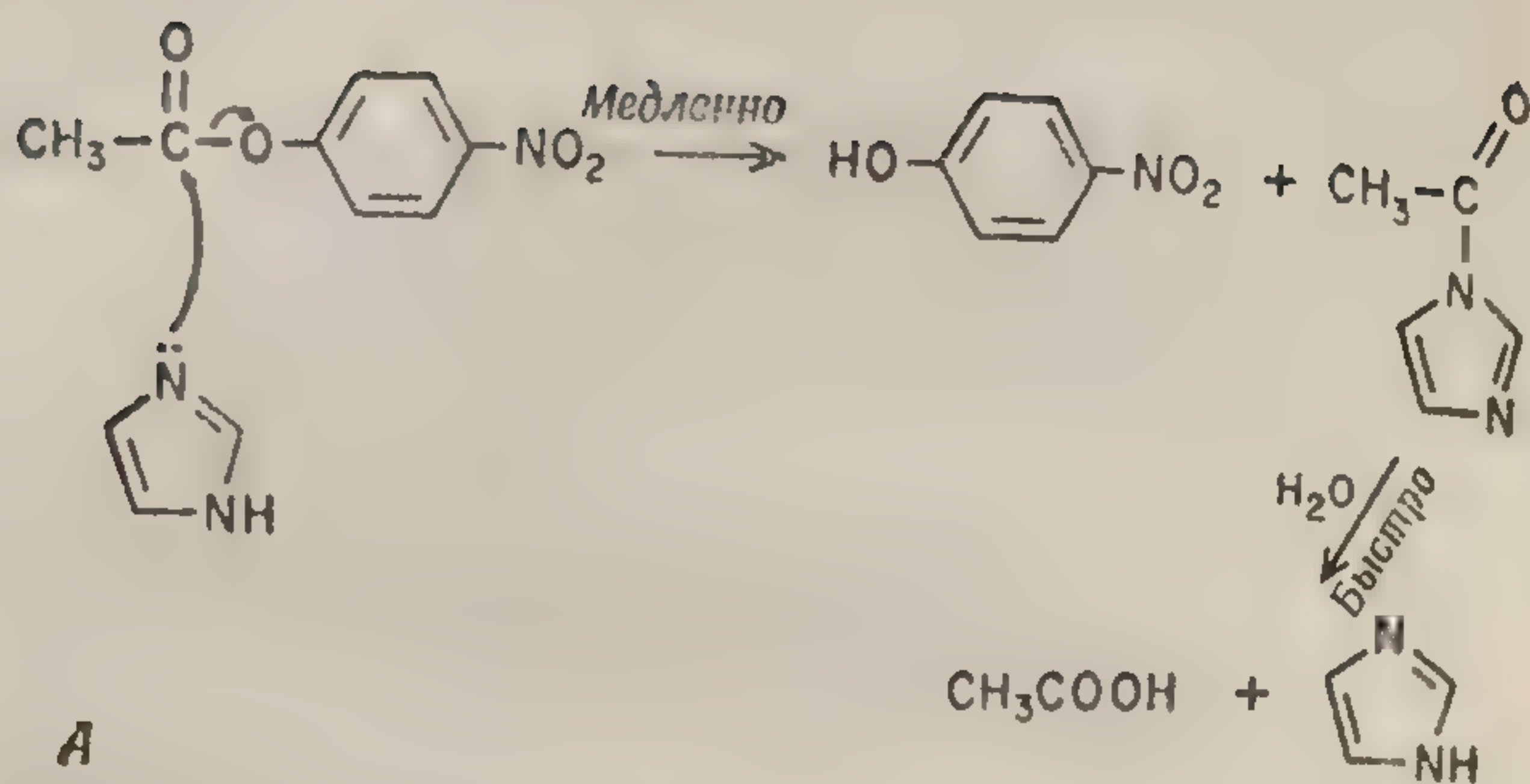
Функциональную группу с выраженной способностью быть донором электронной пары называют *нуклеофилом*. Если в ходе катализируемой реакции катализатор предоставляет электронную пару для субстрата, т. е.



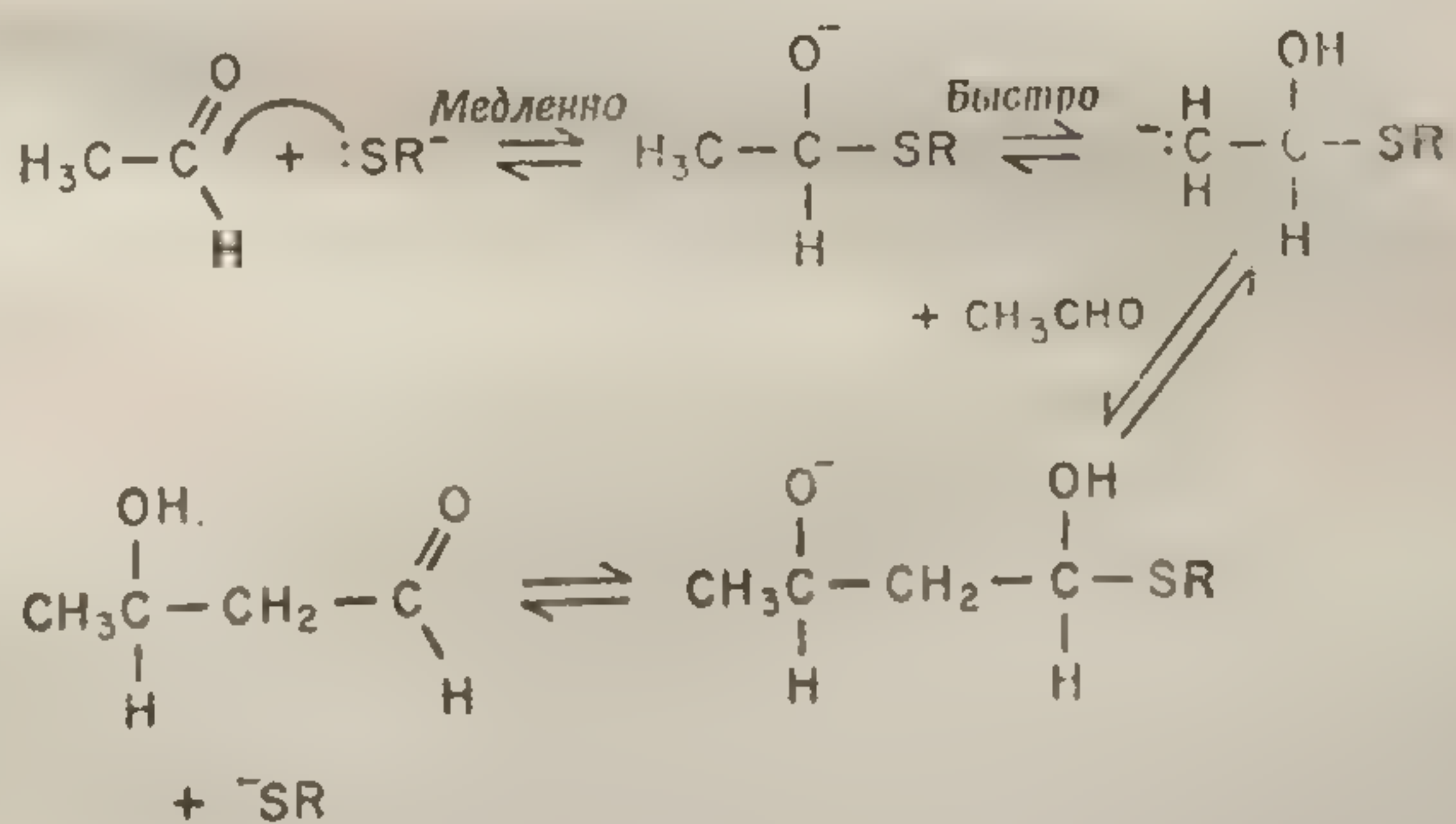
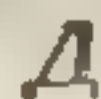


Фиг. 69.  
А-Е. Некоторые примеры нуклеофильного катализа









**А — Е.** Некоторые примеры нуклеофильного катализа.







ческим свойствам) скорости диффузии компонентов прямой реакции будут практически одинаковыми и, следовательно, константы равновесия  $K_a = k_{об}/k_{пр}$  будут непосредственно зависеть от химических факторов, влияющих на протекание обратной реакции (реакции диссоциации). Следует отметить, что эта реакция диссоциации с точки зрения электронной характеристики аналогична обращению нуклеофильной атаки.

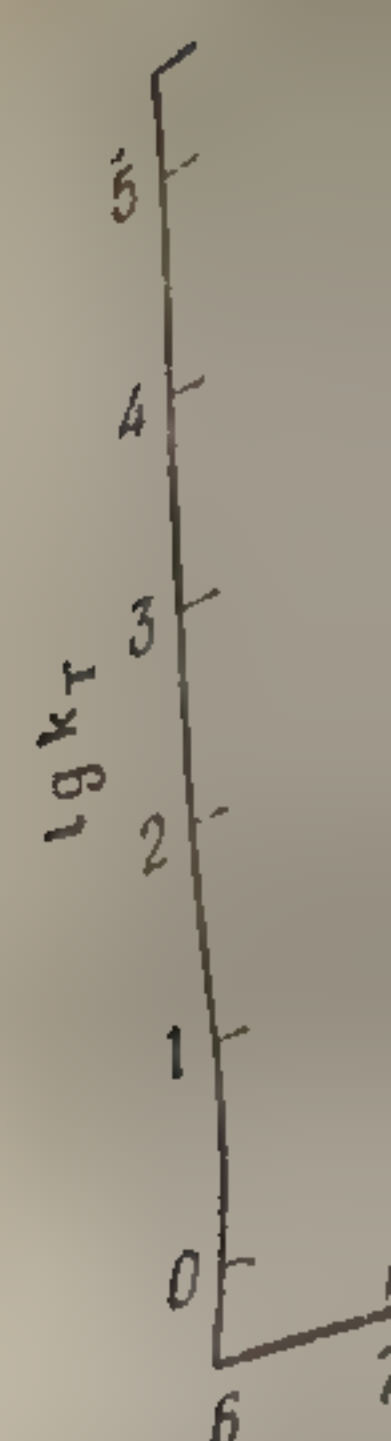


При каждой данной температуре величина  $pK_a$  кислоты является энергетической мерой реакции диссоциации

$$\Delta G^0 = -2,303RT pK_a = RT \ln (k_{об}/k_{пр}) = \\ = RT \ln k_{об} - \text{const}, \quad (\text{VI. 2})$$

где  $\Delta G^0$  — стандартная свободная энергия реакции (VI.1). У ряда нуклеофилов со сходной пространственной структурой энергетический барьер, который необходимо преодолеть при приближении нуклеофила к субстрату (для образования связи между нуклеофильным атомом и атомом субстрата), изменяется в сравнительно небольших пределах. Относительные скорости нуклеофильной атаки в каждом данном случае зависят от энергии, которая требуется для доставки электронной пары к атому субстрата. Так как диссоциация связи нуклеофил—протон является по существу обращением нуклеофильной атаки (для случая, когда «субстратом» служит протон), то между  $pK_a$  сопряженной кислоты нуклеофила и логарифмом константы скорости нуклеофильной реакции должна существовать линейная зависимость [уравнение (VI.2)]. График зависимости  $\lg k$  от  $pK_a$  называют графиком Брэнстеда. Ряд таких графиков приведен на фиг. 70—72. Линейная зависимость обычно наблюдается в тех случаях, когда структуры рассматриваемых нуклеофилов сходны и ни один из нуклеофилов не содержит функциональных

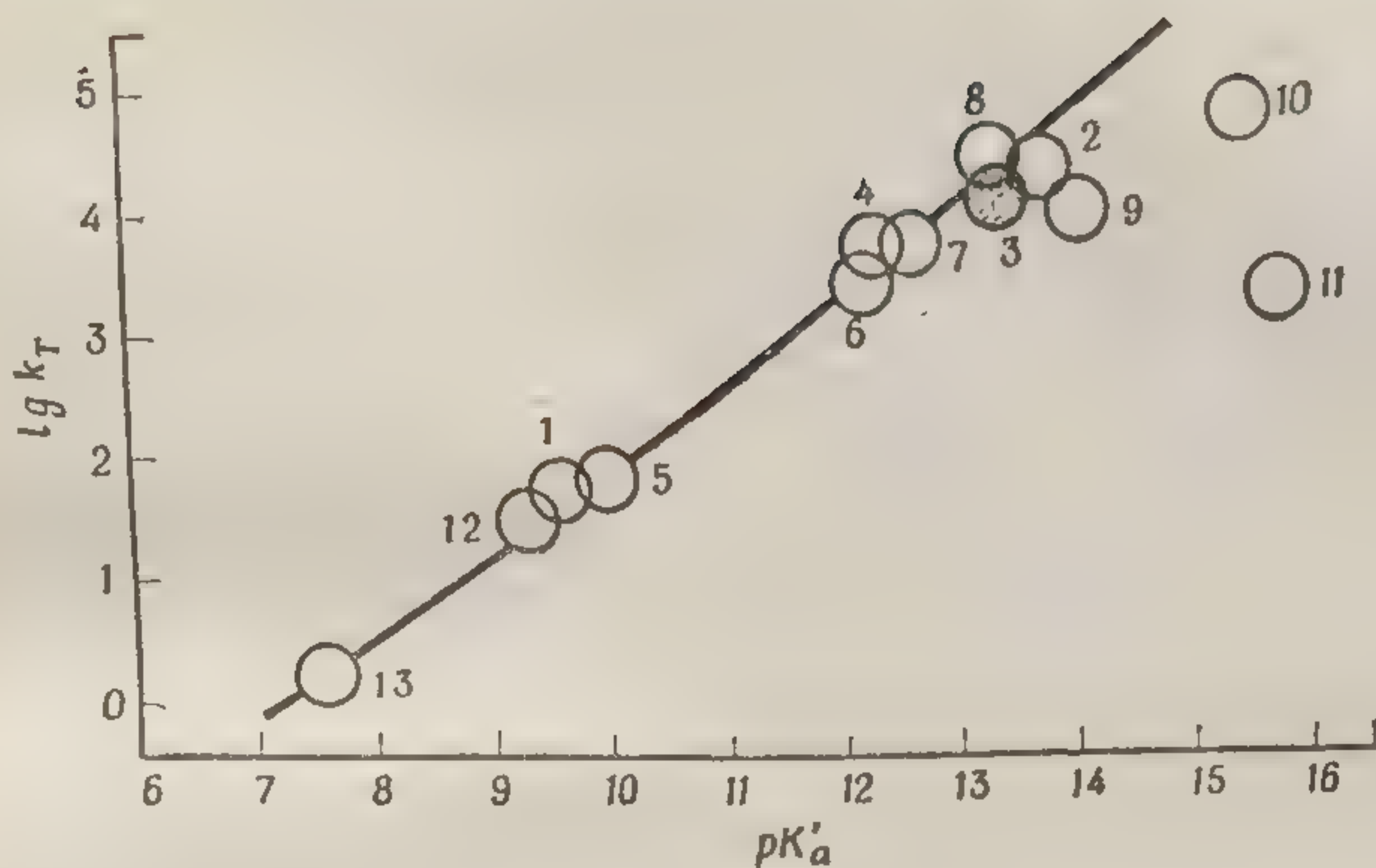



$$\begin{aligned} 1 & - \text{CCl}_3\text{CH}(\text{OH})\text{C} \\ 4 & - \text{F}_3\text{CCH}_2\text{O}^-; \\ 8 & - \text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{O}^- \end{aligned}$$

**Сокращения:** ЭЭГ — этиловый эфир глицина; Гли — глицин; ГГ — глицилглицин; Им — имидазол; АГК — ацетгидроксамовая кислота; БГК — *n*-бутирилгидроксамовая кислота; ХГ — хлоралгидрат (анион, 30°); ИНА — изонитрозоацетон; СА — салицилальдоксим; МА — меркаптоацетат натрия; МЭ — меркаптоэтанол; ИНАА — изонитрозоацетилацетон; ЭДА — этилендиамин; ОФ — *N*-оксифталимид; Кар — карнозин; АО — ацетоксим; БА — трет-бутиламин. Статистическая обработка данных не проводилась.

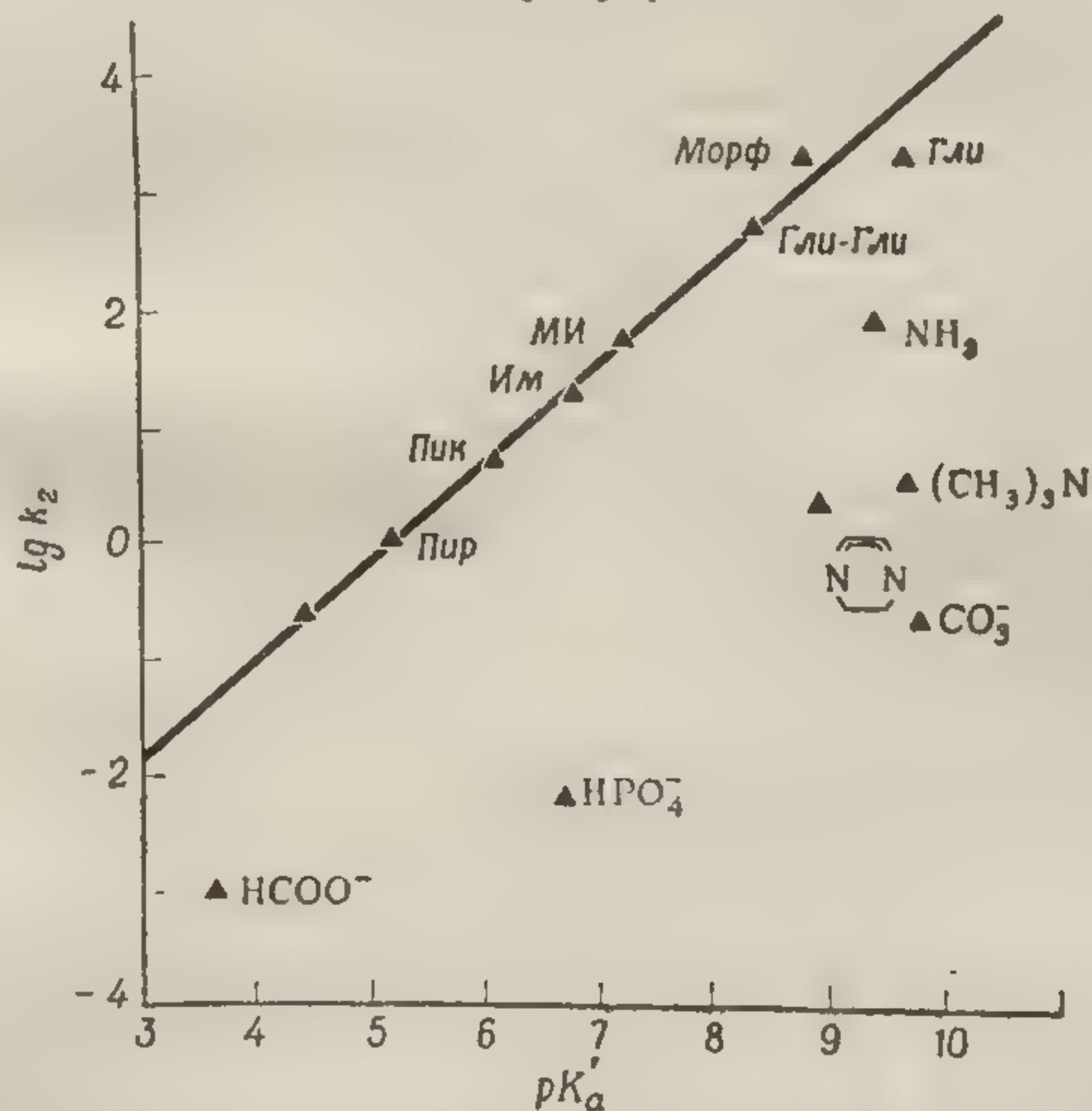
13 Зап





Ф и г. 71. График Брэнстеда для реакций *p*-нитрофенилацетата с соединениями, содержащими нуклеофильный атом кислорода (водный раствор; 25 или 30°).

1 —  $\text{CCl}_3\text{CH}(\text{OH})\text{O}^-$ ; 2 —  $\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3(\text{CH}_2\text{O}^-)$ ; 3 — N-ацетилсеринамид (анион);  
 4 —  $\text{F}_3\text{CCH}_2\text{O}^-$ ; 5 —  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$ ; 6 —  $\text{Cl}_3\text{CCH}_2\text{O}^-$ ; 7 —  $\text{F}_2\text{CH}-\text{CF}_2\text{CH}_2\text{O}^-$ ;  
 8 —  $\text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{O}^-$ ; 9 —  $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{O}^-$ ; 10 —  $\text{CH}_3\text{O}^-$ ; 11 —  $\text{OH}^-$ ; 12 —  $n\text{-ClC}_6\text{H}_4\text{O}^-$ ;  
 13 —  $n\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{O}^-$ .



Ф и г. 72. Зависимость скорости реакций с моноанионом ацетилфенилфосфата от основности атакующего реагента при 39°.

Сокращения; Пир — пиридин; Пик —  $\gamma$ -пиколлин; Им — имидазол; МИ — *N*-метил-имидазол; Морф — морфолин.



групп, создающих пространственные препятствия для нуклеофильной атаки. Если же нуклеофилы сильно различаются по своей электронной или пространственной структуре, то линейной зависимости не наблюдается.

При сравнении различных нуклеофилов следует различать *основность* и *нуклеофильность*. Определяющим фактором является различие в отталкивании электронов, преодолеваемом при образовании связей нуклеофил — субстрат и нуклеофил — протон. Так, длина ковалентной связи между углеродом и серой больше, чем между углеродом и кислородом. Нуклеофильная атака углеродного атома тиолат-анионом ( $RS^-$ ) отличается от аналогичной атаки алкоголят-анионом ( $RO^-$ ) тем, что в первом случае отталкивание электронов выражено слабее, а расстояние между положительно заряженными ядрами больше. Это различие между серой и кислородом при образовании связи с водородом оказывает менее существенное влияние, чем при образовании связи с углеродом (в последнем случае барьер, обусловленный отталкиванием электронов, оказывается более высоким). Следовательно, у соединений серы нуклеофильность выражена сильнее, чем у соединений кислорода, характеризующихся такими же значениями  $pK_a$  (основностями).

Рассматривая вопрос об эффективности ферментативного катализа, следует принимать во внимание не только основность потенциального нуклеофильного остатка фермента, но и ту долю остатков этого рода, которая находится в непротонированной форме при данном значении  $pH$  водной среды. Эта доля ( $\alpha$ ) определяется по формуле

$$\alpha = \frac{K_a}{K_a + [H^+]}. \quad (VI.3)$$

При сравнении эффективности двух нуклеофилов, например  $\epsilon$ -аминогруппы лизина и имидазола гистидина, необходимо учитывать как относительную основность обоих типов остатков (лизин — более сильное основание, поскольку он характеризуется более высоким значением  $pK_a$ ), так и долю остатков того и другого типа, которая находится в непротонированном состоя-

См. табл. 13  
Из табл. 13  
половина азотов  
тогда как из числ  
двух рассматрива  
графиков Брёнсте  
в зависимости о  
ной реакции. С  
Брёнстеда для  
акциям нуклеоф  
ляют интерес с  
тельно превыша  
зависимость ско  
щего нуклеофил

В электрофи  
просто меняются  
место при нукл  
катализатор ак  
Различие межд  
мами катализ  
иметь в виду,  
став белков, и  
нуклеофильных  
разный тип по  
ли, а именно  
нуклеофильны  
торы будут р  
деле, посвяще  
лизу.

Электрофи  
ных стадиях  
димые электро  
кислот) могу  
рами», среди  
таллов. При  
металлов и в  
ным фермента  
В каждом  
электрофильн



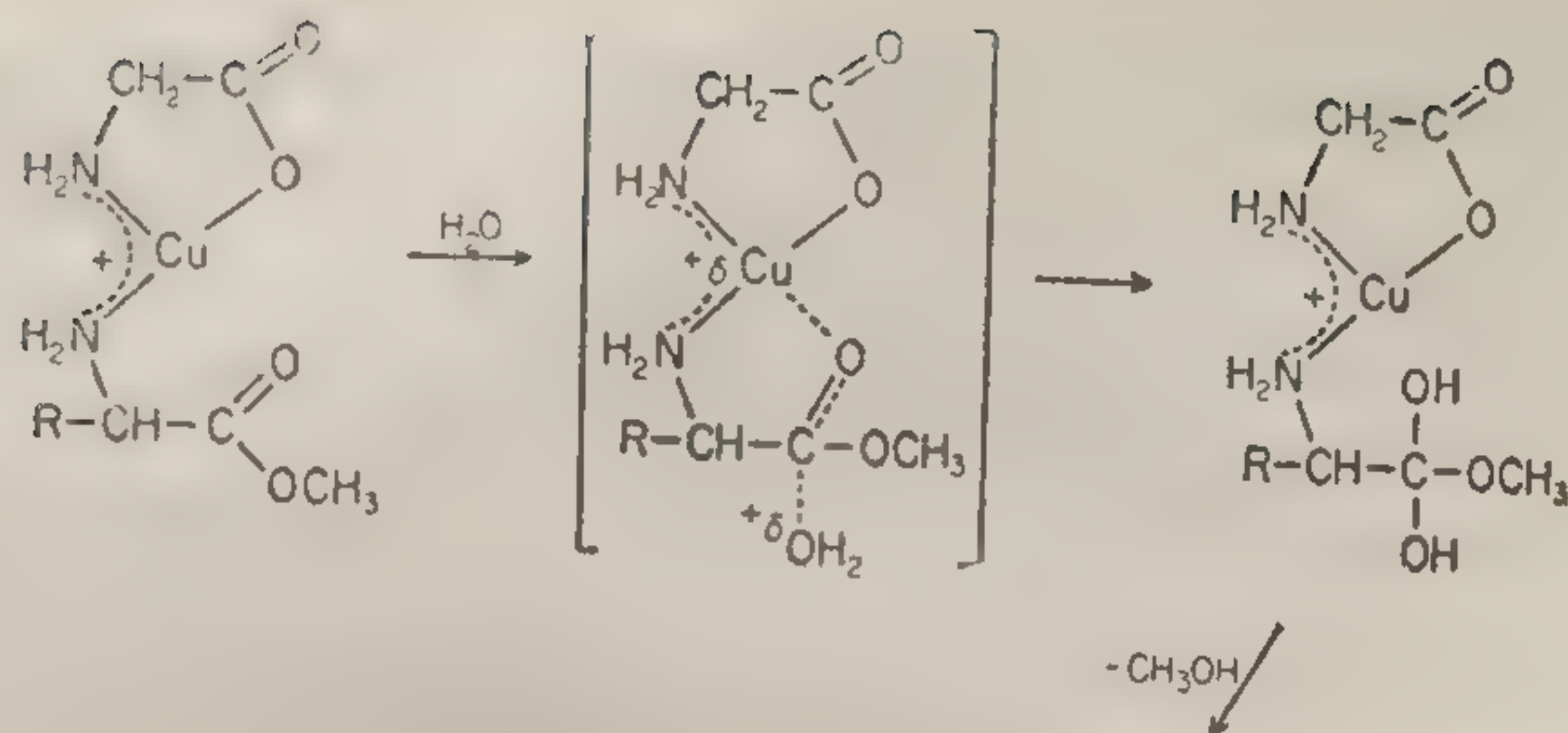
нии. Из табл. 13 видно, что при pH 7,0 приблизительно половина азотов имидазола не будет протонирована, тогда как из числа  $\epsilon$ -аминогрупп менее 1% будет находиться в основной форме. Относительная важность двух рассматриваемых факторов отражается наклоном графиков Брэнстеда (фиг. 70). Этот наклон различен в зависимости от характера протекающей нуклеофильной реакции. Следует отметить, что наклон графика Брэнстеда для модельных реакций, близких к тем реакциям нуклеофильного катализа, которые представляют интерес с биологической точки зрения, значительно превышает единицу; это указывает на сильную зависимость скорости реакции от основности атакующего нуклеофила.

### Электрофильный катализ

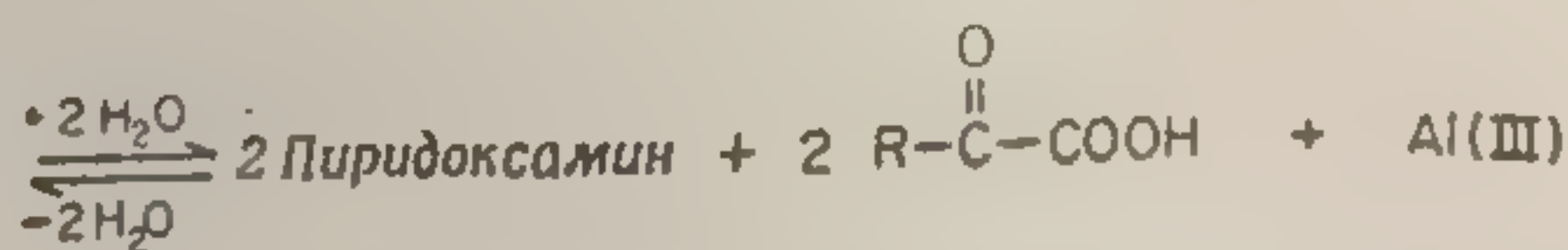
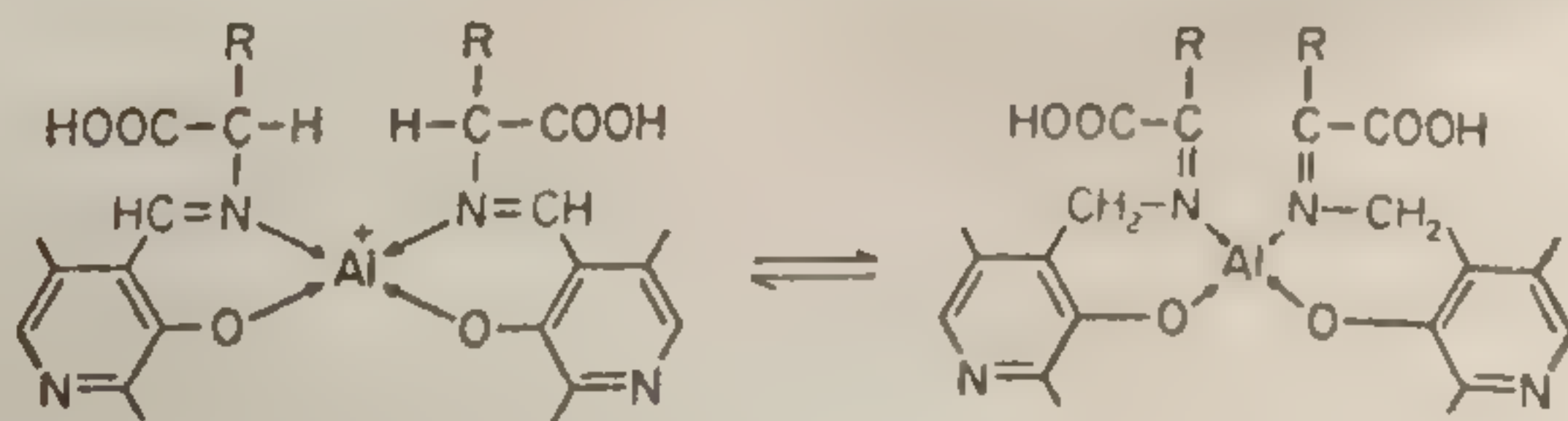
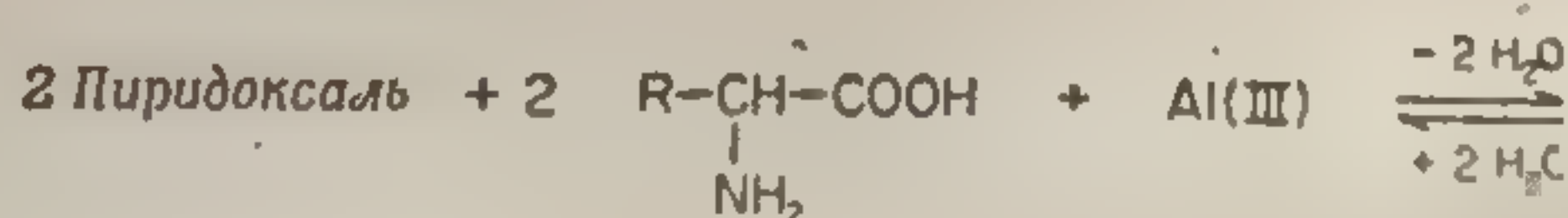
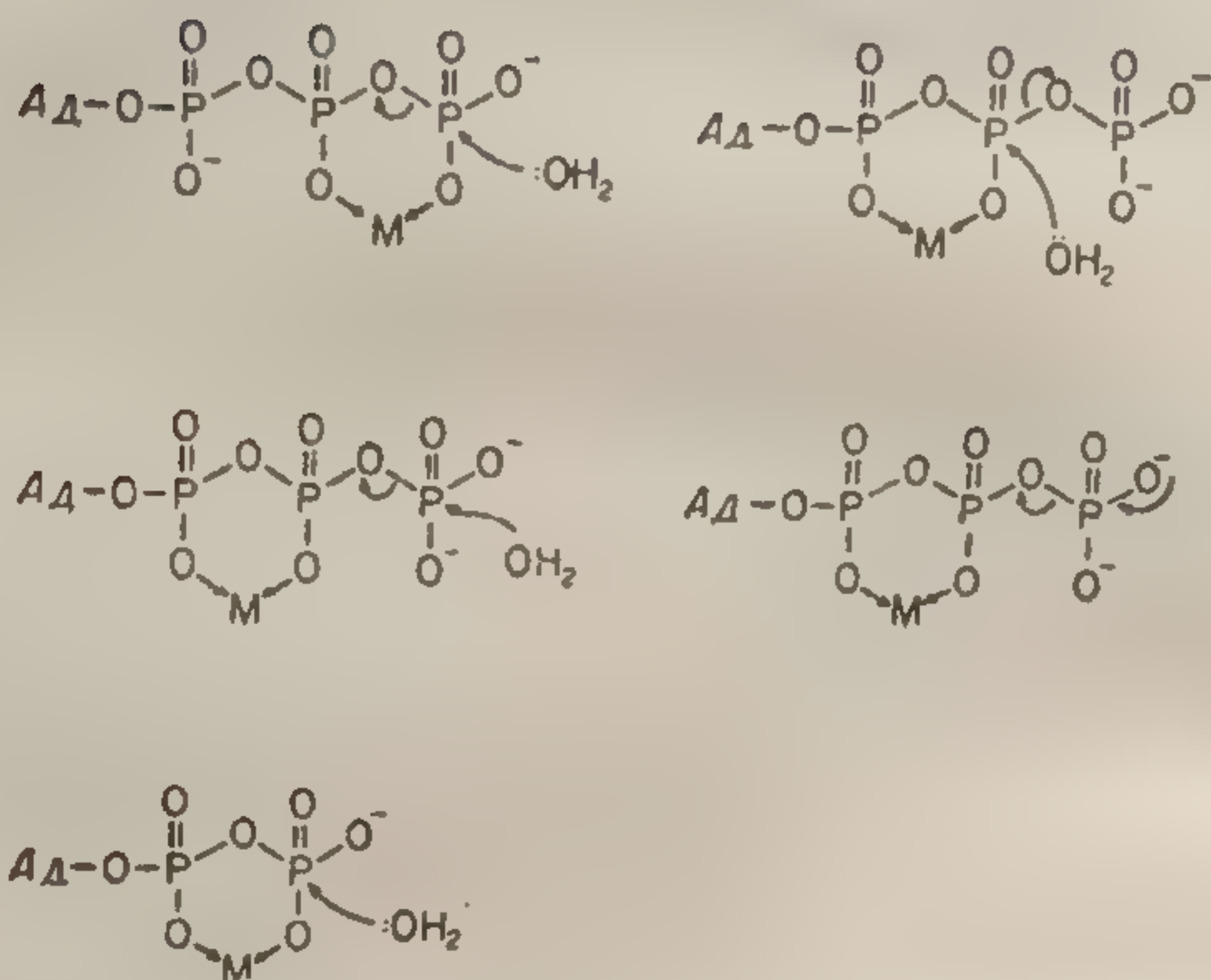
В электрофильном катализе катализатор и субстрат просто меняются ролями по сравнению с тем, что имеет место при нуклеофильном катализе: электрофильный катализатор акцептирует пару электронов от субстрата. Различие между этими двумя комплементарными формами катализа провести нетрудно; однако следует иметь в виду, что у аминокислот, которые входят в состав белков, имеется по крайней мере семь различных нуклеофильных боковых цепей и только один своеобразный тип потенциально электрофильной боковой цепи, а именно протонированные сопряженные кислоты нуклеофильных оснований. Эти кислотные катализаторы будут рассмотрены отдельно в следующем разделе, посвященном общему кислотно-основному катализу.

Электрофильный катализ играет роль в промежуточных стадиях многих ферментативных реакций. Необходимые электрофилы (помимо упомянутых сопряженных кислот) могут поставляться небелковыми «кофакторами», среди которых важную роль играют ионы металлов. Примеры реакций, катализируемых ионами металлов и в известной мере аналогичных определенным ферментативным реакциям, приведены на фиг. 73. В каждом из этих примеров ион металла служит электрофильным катализатором.





Гидролиз



Фиг. 73. Катализ ионами металлов.

Ад — аденозил. Структуру пиридоксалья и пиридоксамин см. в разд. 1 гл. VII.

Схема  
2. ОБЩ

В ходе м  
перенос про  
(от одного а  
к другому.

Фиг. 74. Прим

протона осу  
зано на фи  
тирующей с  
жет катализ  
эффективно  
нуклеофиль  
более эффе  
на реакцио  
как это пок

N: (+)

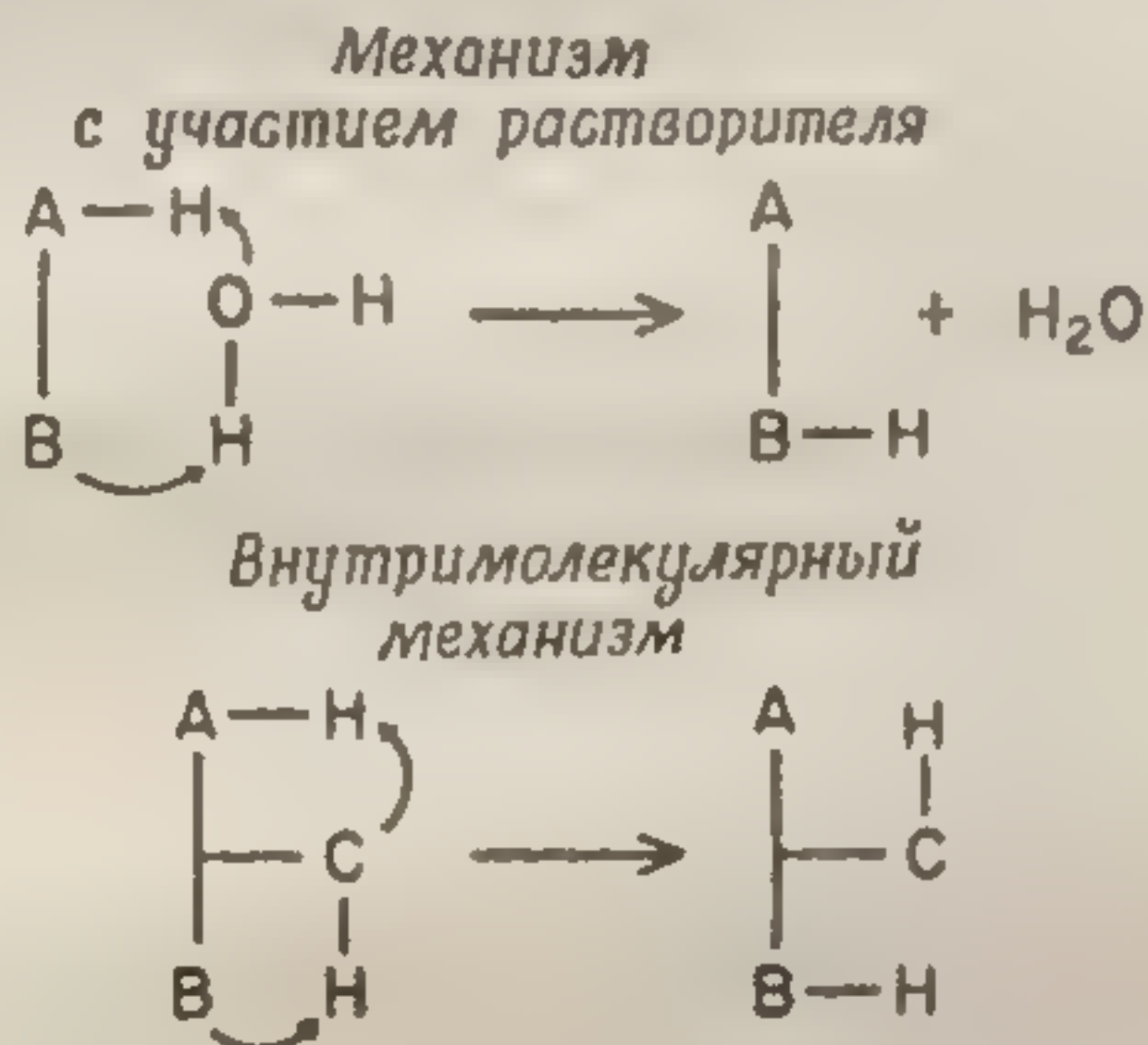
В: H

С другой ст  
фильная ата  
рительного



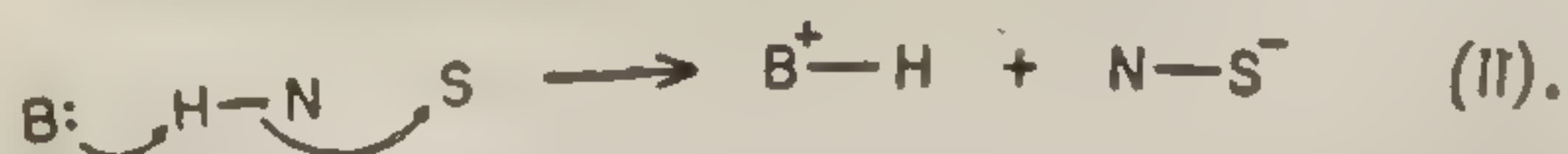
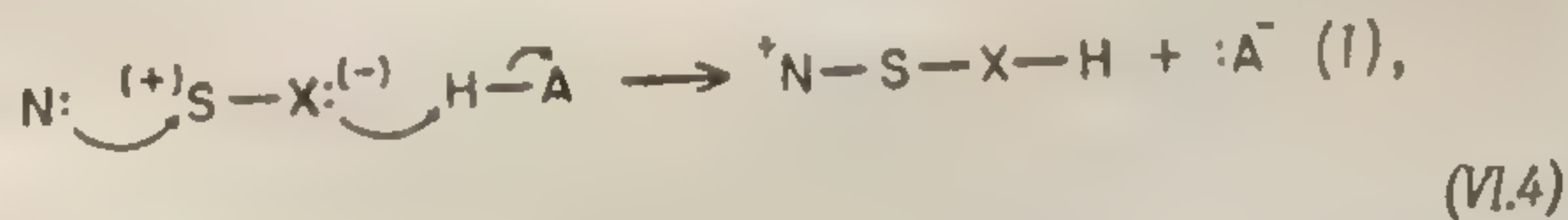
## 2. ОБЩИЙ КИСЛОТНО-ОСНОВНОЙ КАТАЛИЗ

В ходе многих биологических реакций происходит перенос протона либо в пределах молекулы субстрата (от одного атома к другому), либо от одного субстрата к другому. В гомогенных водных растворах перенос



Фиг. 74. Примеры процессов переноса протона в химических реакциях.

протона осуществляется двумя путями, как это показано на фиг. 74. Если перенос протона является лимитирующей стадией суммарной реакции, то реакция может катализироваться соединениями, способными более эффективно осуществлять перенос протона. Многие нуклеофильные или электрофильные реакции протекают более эффективно при одновременном переносе протона на реакционноспособный центр субстрата или от него, как это показано в механизме I уравнения (VI.4).



С другой стороны, сама нуклеофильная или электрофильная атака может облегчаться в результате предварительного переноса протона от нуклеофила или на

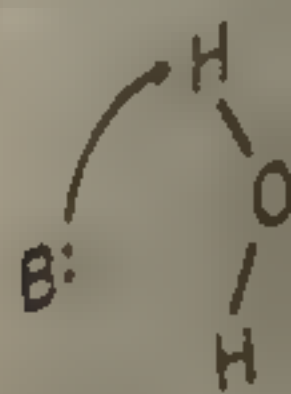


электрофил (механизм II). Если скорость катализируемой реакции непосредственно зависит от протонодonorных или протоноакцепторных свойств катализатора, то реакцию рассматривают как специфически катализируемую кислотой или соответственно основанием. Если же данную реакцию могут катализировать различные кислоты и основания, то говорят об *общем кислотном* или *общем основном* катализе. Механизм, приведенный в уравнении (VI.4), может включать стадии как общего кислотного (или общего основного), так и нуклеофильного (или электрофильного) катализа. В определенных условиях скорость реакции, протекающей по такому механизму, может зависеть от каждого из этих двух типов катализа. Если различие скоростей соответствующих стадий велико, то скорость суммарной реакции определяется *более медленной* стадией. Принципиальное различие между двумя типами механизмов, контролирующих скорость реакции, сводится к различию между процессом *образования (или разрыва) связей* и процессом *переноса протона*. Оба эти типа процессов принимают участие в реакциях, катализируемых ферментами. Естественно возникает вопрос, какой из них лимитирует скорость реакции. В гомогенных водных растворах часто (но отнюдь не всегда) более медленным процессом является нуклеофильно-электрофильная атака. Для ряда конкретных случаев (которые будут рассмотрены ниже) совокупность полученных данных говорит в пользу того, что рассматриваемые процессы протекают «сочетанно», т. е. что они осуществляются на одной и той же стадии реакции.

### Общий кислотно-основной катализ и зависимость от pH

Все сопряженные кислотные остатки, встречающиеся в ферментных белках (табл. 13), могут функционировать как общие кислотные катализаторы; сходным образом все сопряженные основные формы могут выступать в качестве катализаторов общего основного типа, как это следует из большого числа аналогичных реакций катализа в гомогенных растворах. Рассмотрим про-

См. также  
статью реакции  
пример



Для при  
творе скоро

При лю  
ного основа  
(VI.3):

где  $B_0$  — су  
пряженной  
жающее за  
в виде

Рассмо  
чающий п  
нием очен  
лотным к

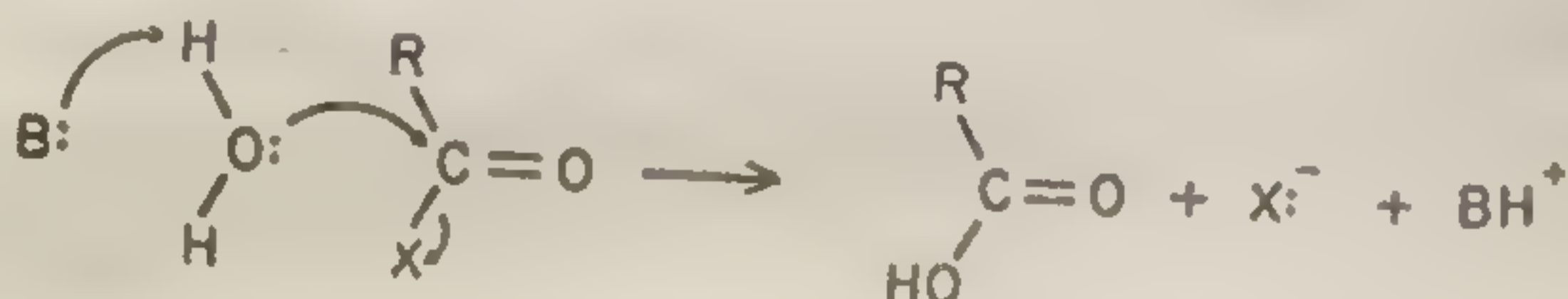
НО

Уравне  
щий вид:

$$v = k [S]$$



стую реакцию типа общего основного катализа, например



Для приведенного механизма реакции в водном растворе скорость выражается следующим образом:

$$v = k [\text{H}_2\text{O}] [\text{S}] [\text{B:}] = k' [\text{S}] [\text{B:}]. \quad (\text{VI. 5})$$

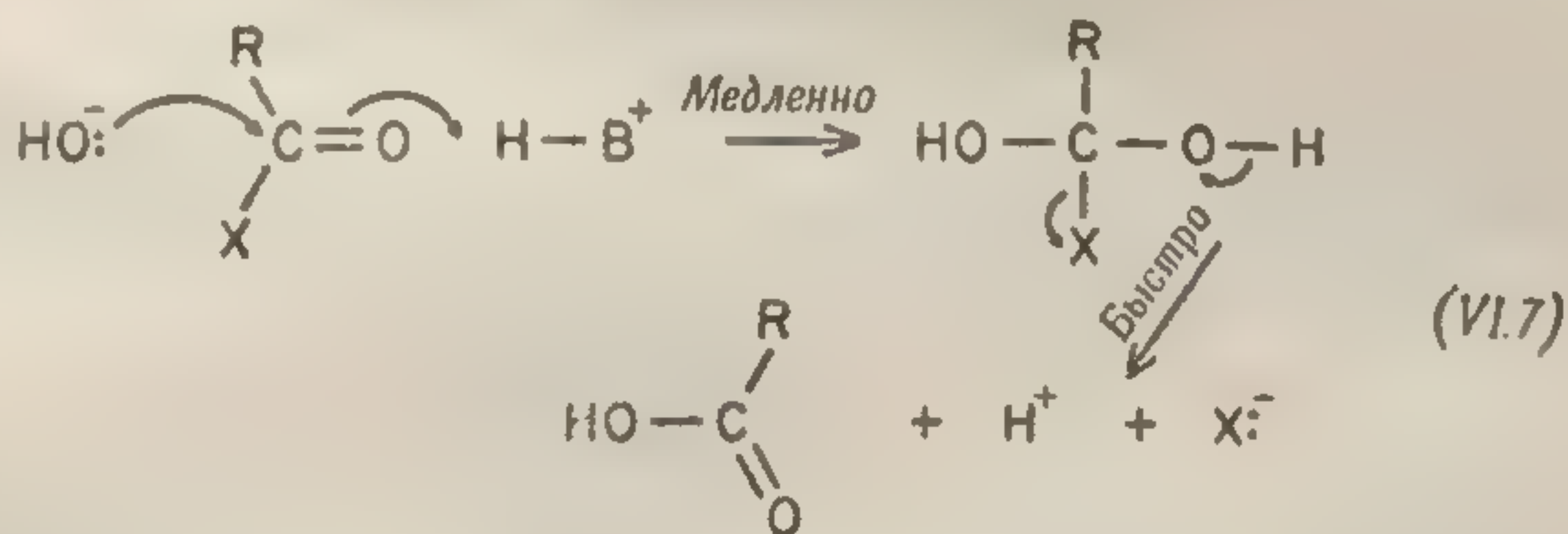
При любом значении pH концентрацию сопряженного основания можно определить, исходя из уравнения (VI.3):

$$[\text{B:}] = B_0 \{K_a / (K_a + [\text{H}^+])\},$$

где  $B_0$  — суммарная концентрация основания и его сопряженной кислоты. Выражение для скорости, отражающее зависимость от pH (гл. V), можно записать в виде

$$v = k' [\text{S}] B_0 \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} = k'' [\text{S}] \frac{B_0}{K_a + [\text{H}^+]}. \quad (\text{VI. 6})$$

Рассмотрим теперь более сложный механизм, включающий нуклеофильную атаку сопряженным основанием очень слабой кислоты, сочетанную с общим кислотным катализом [уравнение (VI.7)].

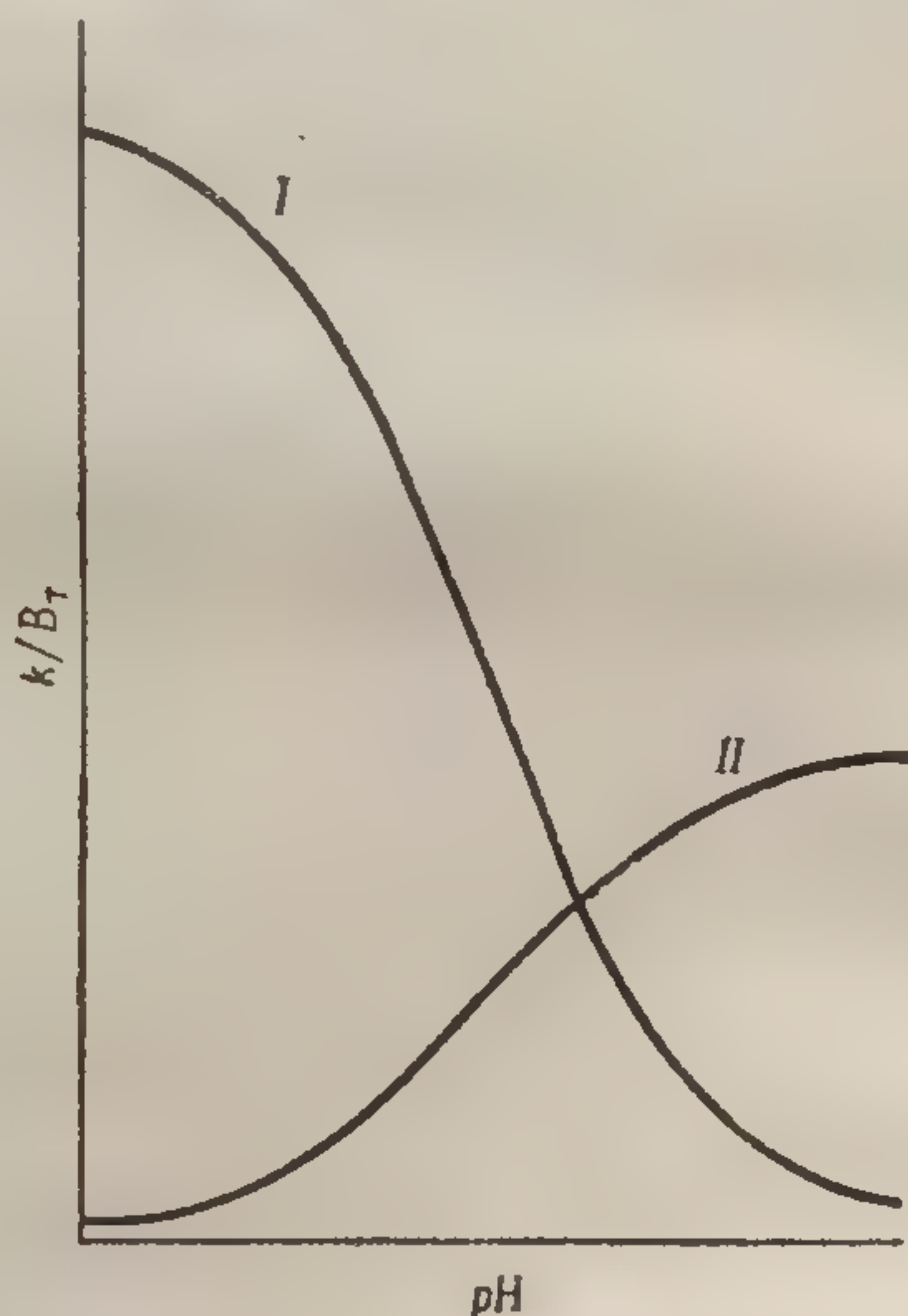


Уравнение скорости для этого случая имеет следующий вид:

$$v = k [\text{S}] [\text{OH}^-] [\text{BH}^+] = \frac{k K_w [\text{S}] [\text{BH}^+]}{[\text{H}^+]} = \frac{k K_w [\text{S}] B_0}{K_a + [\text{H}^+]}, \quad (\text{VI. 8})$$



где  $K_w = [H^+][OH^-]$ . Если  $pK_a$  сопряженной кислоты нуклеофила (в данном случае, для воды,  $pK_a = 15,8$ ) больше любого значения  $pH$  опытной смеси, то механизмы, описываемые уравнениями (VI.6) и (VI.8), кинетически неразличимы.



Фиг. 75. Графики зависимости скорости от  $pH$  для реакций с участием одиночных кислотной (I) и основной (II) групп.

Для механизма общего кислотного катализа зависимость скорости реакции от  $pH$  описывается следующим уравнением:

$$v = \frac{k [S] B_0 [H^+]}{K_a + [H^+]}. \quad (VI.9)$$

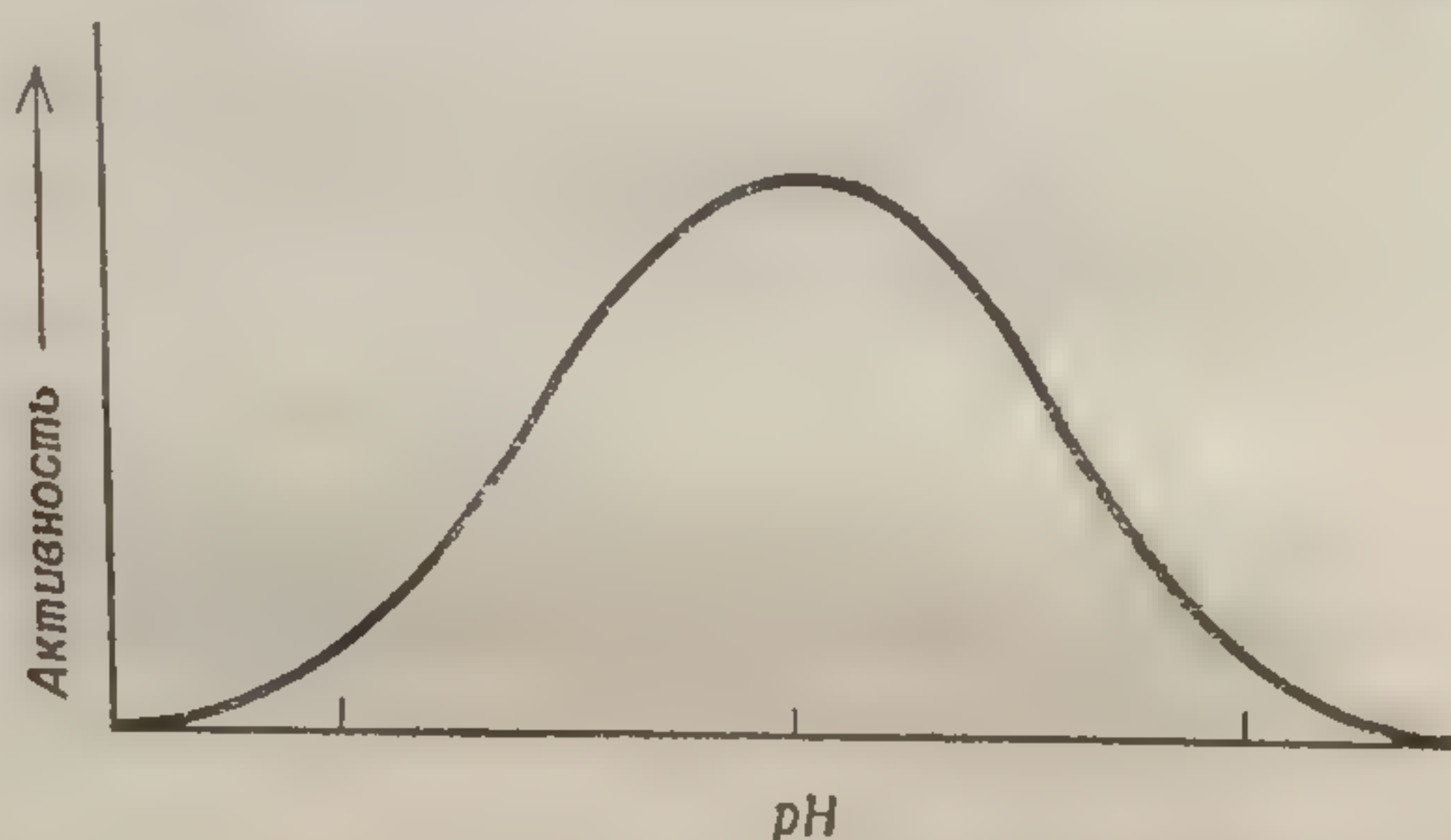
И здесь механизм, включающий электрофильную атаку в сочетании с общим основным катализом, кинетически неотличим от механизма общего кислотного катализа. Зависимость скорости реакции от  $pH$  для всех механизмов, в которых скорость суммарного процесса







При осуществлении такого сочетанного кислотно-основного катализа график рН—скорость реакции имеет колоколообразную форму, которая определяется значениями  $pK_a$  обобщенной кислоты ( $B_1H^+$ ) и сопряженной кислоты обобщенного основания ( $B_2$ ). Если поменять



Ф и г. 76. Колоколообразная кривая, описывающая зависимость активности фермента от рН.

ролями обобщенную кислоту и обобщенное основание [уравнение (VI.10, Б)], то скорость реакции будет описываться уравнением

$$v = \frac{k (B_1)_0 (B_2)_0 K_2 [H^+]}{(K_1 + [H^+]) (K_2 + [H^+])}, \quad (VI.11)$$

неотличимым от уравнения для модели (VI.10, А).

### 3. СКОРОСТЬ ПЕРЕНОСА ПРОТОНОВ

В последнее время с появлением методики определения скоростей сверхбыстрых реакций (разд. 7 гл. IV) удалось измерить скорость переноса протона (в водных растворах) между кислотой и сопряженным основанием для различных пар кислота—основание:



В табл. 15 приведены значения констант скоростей. Эти количественные данные весьма важны для понимания механизма ферментативного катализа. Чтобы катализатор, выступающий как обобщенная кислота или

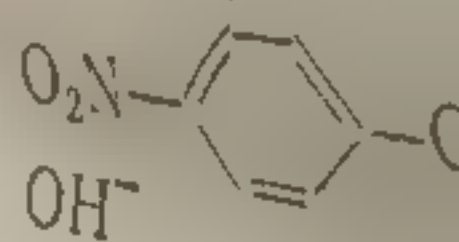
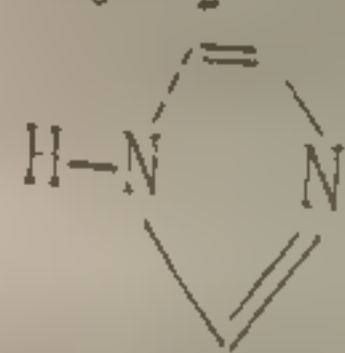
Скорости пер

В

OH<sup>-</sup>  
OH<sup>-</sup>

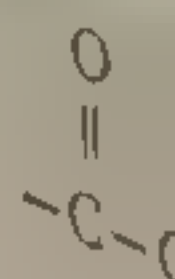
OH<sup>-</sup>  
OH<sup>-</sup>

CH<sub>3</sub>COS<sup>-</sup>HCOS<sup>-</sup>  
CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>



Реакция

должна катализир  
Реакция кон  
которая протекает

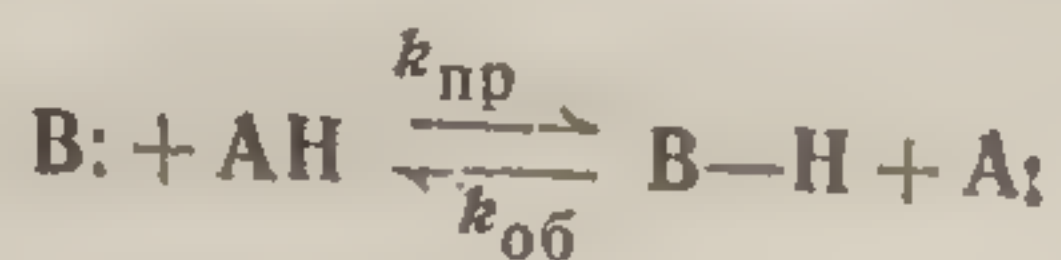




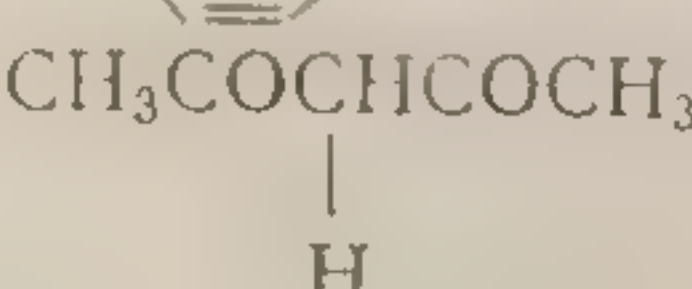
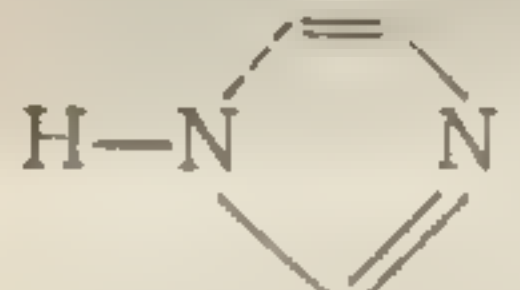

катализируется об  
электрофильная гр  
2) Констант  
тые переносятся



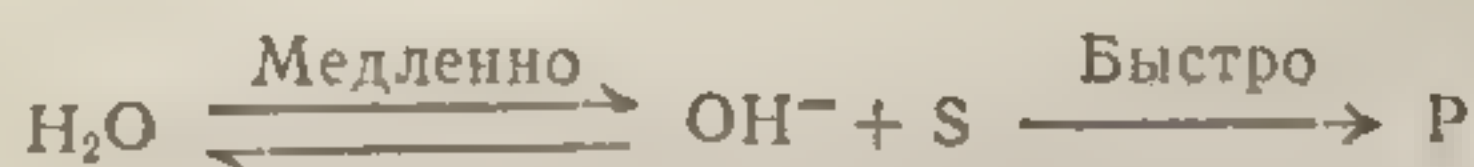
Таблица 15

Скорость переноса протонов при нейтральном значении pH  
(25°, H<sub>2</sub>O)<sup>1, 2)</sup>

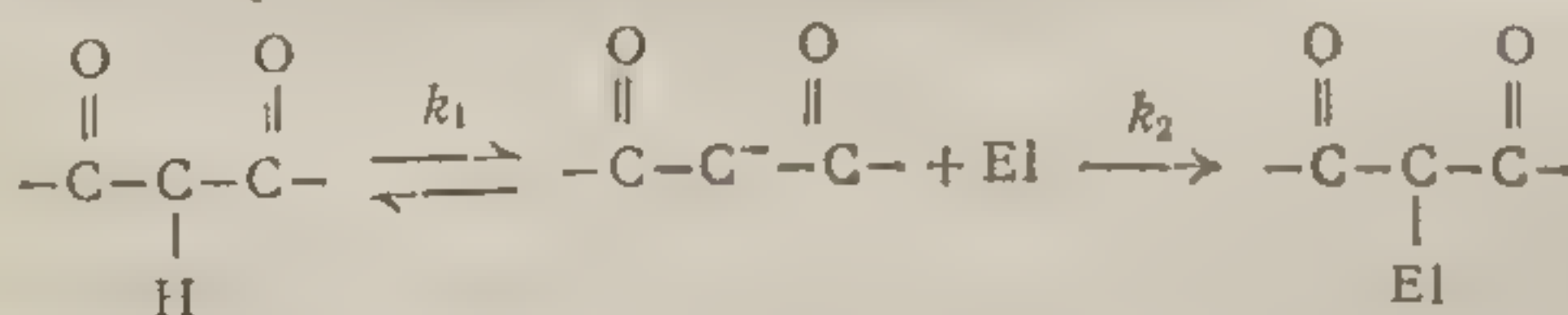


B	AH	$v_{пр}, \text{сек}^{-1}$	$v_{об}, \text{сек}^{-1}$
OH <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	4 · 10 <sup>3</sup>	2 · 10 <sup>4</sup>
OH <sup>-</sup>		2,5 · 10 <sup>3</sup>	1,2 · 10 <sup>3</sup>
OH <sup>-</sup>		1,4 · 10 <sup>3</sup>	2 · 10 <sup>3</sup>
OH <sup>-</sup>		4 · 10 <sup>-3</sup>	~ 10 <sup>-2</sup>
CH <sub>3</sub> COS <sup>-</sup> HCOSCH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	1,2	1,4 · 10 <sup>-2</sup>
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	4,5 · 10 <sup>3</sup>	4 · 10 <sup>3</sup>
	H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	1,5 · 10 <sup>3</sup>	0,8 · 10 <sup>3</sup>
	H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	3,6 · 10 <sup>3</sup>	1,3 · 10 <sup>3</sup>
OH <sup>-</sup>	H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	1,4 · 10 <sup>4</sup>	2,5 · 10 <sup>-5</sup>

<sup>1)</sup> Реакция



должна катализироваться имидазолом или фенолом (общий основной катализ).  
Реакция конденсации у центрального углеродного атома ацетилацетона, которая протекает через образование карбаниона, а именно



катализируется общим основанием, если  $k_2 \geq k_1$  (символом El обозначена здесь электрофильная группа).

<sup>2)</sup> Константы скорости выражены через число эквивалентов протонов, которые переносятся на основание за секунду.



Продолжение табл. 15

В	АН	$v_{\text{пр}}, \text{сек}^{-1}$	$v_{\text{об}}, \text{сек}^{-1}$
$\text{CH}_3\text{CO}_2^-$	$\text{CH}_3\text{COSHCOCH}_3$   Н	2,5 <sup>3)</sup>	$2 \cdot 10^2$ <sup>3)</sup>
Имидазол	$\text{CH}_3\text{COSHCOCH}_3$   Н	4,5 <sup>3)</sup>	$5 \cdot 10^2$ <sup>3)</sup>
Фенол	$\text{CH}_3\text{COSHCOCH}_3$   Н	$\sim 10$ <sup>3)</sup>	$6 \cdot 10^2$ <sup>3)</sup>

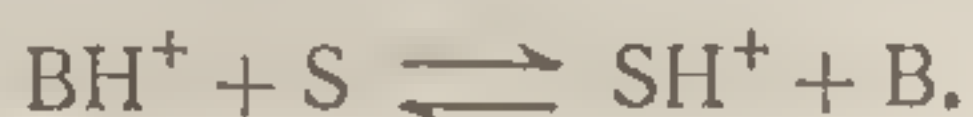
<sup>3)</sup> При суммарной концентрации «В» ( $[\text{В}] + [\text{ВН}]$ ), равной 1 М.

обобщенное основание, вернулся в исходное состояние (т. е. в свою активную форму, способную инициировать новый цикл катализа), должны осуществиться обе реакции переноса протона (прямая и обратная). Катализатор, протонируемый в ходе реакции общего основного катализа, должен перенести свой протон либо обратно на субстрат, либо на акцептор протонов (например, водный растворитель), чтобы возвратиться в исходную, каталитически активную форму.

Рассматривая приведенные в таблице данные, можно убедиться в том, что обобщенное основание, которое акцептирует протон с относительно большой скоростью в зоне нейтральных значений pH, образует сопряженную кислоту, относительно медленно отдающую протон; обе скорости коррелируют с силой соответствующего основания и кислоты. Для ферментативного катализа в водном растворе оптимальная ситуация создается в том случае, когда сила данного основания равна силе его сопряженной кислоты, т. е. когда  $pK_a$  водных растворов лежит в нейтральной зоне. Среди боковых цепей белковой молекулы, которые могут играть роль кислотно-основных катализаторов, этому требованию в наибольшей мере удовлетворяет имидазольная группа гистидина. В водных растворах максимальная



скорость реакций, катализируемых имидазолом (или его кислотной формой — имидазолем), при  $[S] \gg B_0$  определяется константой скорости более медленной из двух фаз переноса протона



Полученные к настоящему времени данные показывают, что в оптимальных условиях эта скорость в нейтральной зоне рН характеризуется величиной примерно  $10^3 \text{ сек}^{-1}$  (различия не превышают одного порядка). По своему абсолютному значению эта величина поразительно близка к числу оборотов тех ферментов, механизм действия которых связан с переносом протона. Данное обстоятельство — веский довод в пользу того, что именно перенос протона является в этих ферментативных реакциях стадией, лимитирующей скорость. Так как, помимо переноса протона, механизм этих реакций включает и другие стадии, например нуклеофильную атаку, электрофильную атаку или одноэлектронный перенос (см. ниже), то следует заключить, что скорость этих последних стадий либо сопоставима по величине со скоростью переноса протона, либо превышает ее. Таким образом, различие между ферментативным катализом и катализом в гомогенном водном растворе заключается, по-видимому, в том, что в первом случае образование и разрыв связей в процессе переноса протона протекают с более высокой скоростью.

Следует отметить, что константы скоростей каталитических реакций в гомогенных растворах почти всегда значительно ниже, чем у аналогичных ферментативных реакций. Когда нуклеофильная или электрофильная атака осуществляется *межмолекулярно*, то и *энтропийные* факторы (обусловленные наличием поступательных и вращательных степеней свободы у реагентов) и факторы, обусловленные взаимодействием атакующего агента с растворителем, в значительной мере препятствуют приближению атакующего агента к реакционному центру. В ферментативном катализе тормозящее влияние этих факторов может быть значительно ослаблено или вообще снято. Если энергетический барьер, преодолеваемый при образовании химической связи



между катализатором и субстратом, не слишком высока, то вероятность того, что стадией, лимитирующей скорость суммарного процесса, окажется стадия переноса протона, значительно увеличивается.

Согласно теории абсолютных скоростей реакций (хотя и приближенной, но весьма полезной), значение удельной константы скорости определяется следующим выражением:

$$k = \frac{RT}{Nh} \exp\left(\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \approx \\ \approx 10^{13} (\text{сек}^{-1}) \exp\left(\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right), \quad (\text{VI. 12})$$

где  $R$  — газовая постоянная,  $N$  — число Авогадро,  $h$  — постоянная Планка,  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  — изменения энтальпии и энтропии при переходе реагентов из исходного состояния в состояние с наибольшим запасом энергии.

При какой величине энергетического барьера  $\Delta H^\ddagger$  [определяемого по уравнению (VI. 12)] перенос протона может оставаться стадией, лимитирующей скорость? Так как в ферментативном катализе скорость переноса протона характеризуется величиной порядка  $10^3 \text{ сек}^{-1}$ , то энергетический барьер нуклеофильной или электрофильной атаки должен быть, очевидно, таким, чтобы определяемая им константа скорости превосходила приведенную выше величину. Если допустить, что в случае ферментативного катализа энтропийным фактором можно пренебречь ( $\Delta S^\ddagger = 0$ ), то уравнение (VI. 12) упрощается и принимает вид

$$k \approx 10^{13} \exp\left(\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT}\right).$$

Если  $k$  для любого химического процесса выражается величиной порядка  $10^5 \text{ сек}^{-1}$  или больше, то  $\Delta H^\ddagger$  должно быть меньше 11 ккал/моль. Эта максимальная величина энергетического барьера для переноса электрон-



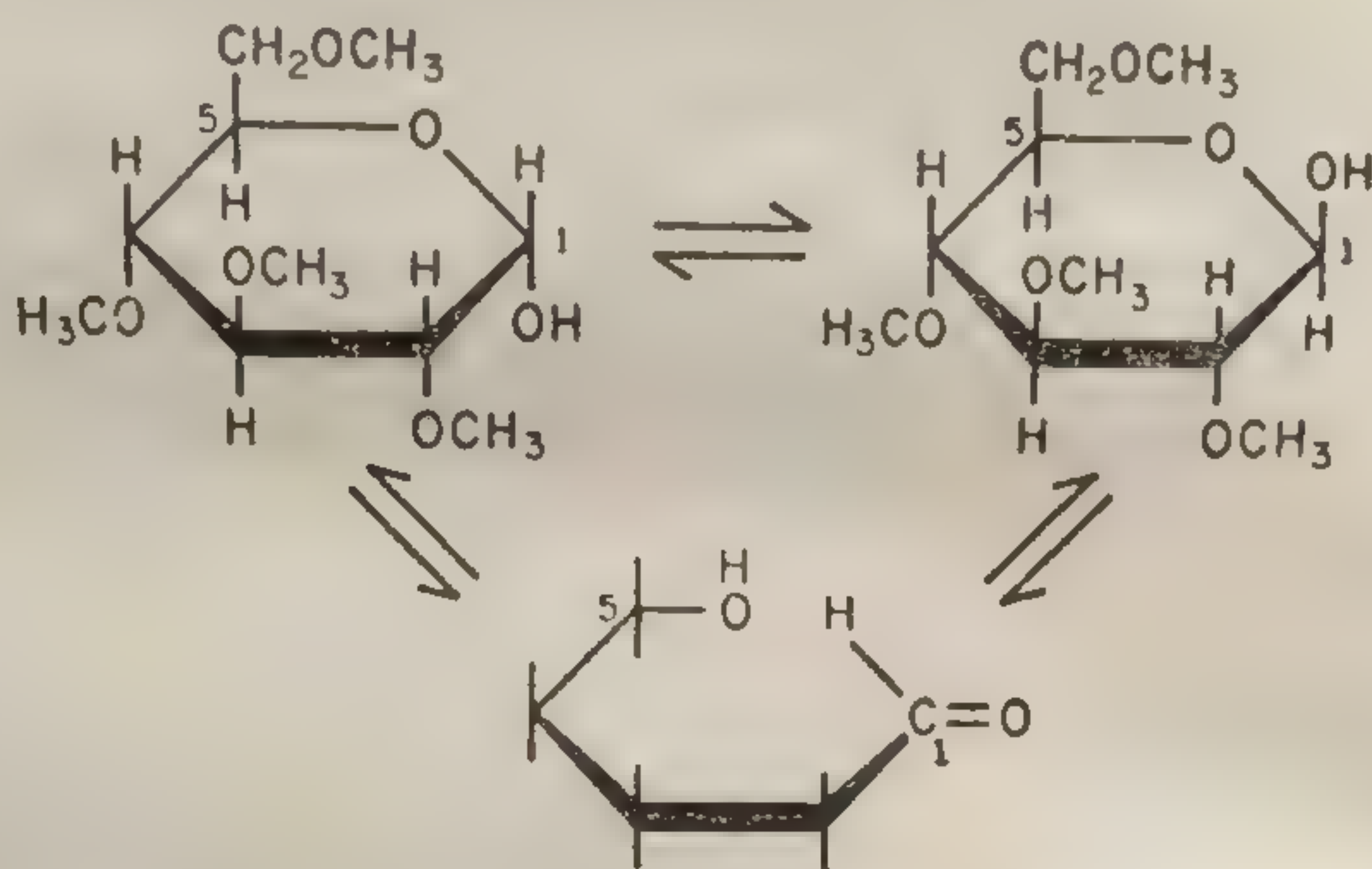
ной пары находится в области значений энергий активации многих катализируемых реакций, протекающих в гомогенных растворах. Для неферментативных реакций, протекающих в гомогенных водных растворах, значение  $\Delta S^\ddagger$  всегда отрицательно.

#### 4. ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЙ КАТАЛИЗ

Из сказанного выше ясно, что при любом механизме, контролирующем скорость ферментативной реакции, константа скорости суммарной реакции имеет величину порядка  $10^3 \text{ сек}^{-1}$  (или больше). Соответствующие реакции в гомогенных растворах протекают значительно медленнее. Каким образом можно объяснить столь большие скорости различных ферментативных реакций? Ферментативный катализ отличается от катализа в гомогенных растворах прежде всего жесткой локализацией каталитического участка и реакционного центра, складывающейся в процессе образования фермент-субстратного комплекса. С кинетической точки зрения этот фермент-субстратный комплекс можно рассматривать как единую молекулу, в которой реакционный центр и каталитическая группа сближены («одномолекулярная» модель). Синтезировав соединения, содержащие и реакционный центр и предполагаемые каталитические группы, можно исследовать на этих синтетических «ферментных моделях», как влияет такое «принудительное сближение» на скорость реакции. Если имеются основания предполагать, что в действии фермента участвует более одной каталитически активной группы, то можно исследовать влияние принудительного сближения двух или нескольких таких групп, синтезировав би- или полифункциональные модельные катализаторы. Интересным примером такого рода катализа является эффективный бифункциональный катализ реакции мутаротации производных глюкозы (фиг. 77) в органических растворителях. Подобные реакции хорошо известны в биохимии. Мутаротация глюкозы в воде катализируется как обобщенными кислотами, так и обобщенными основаниями. Однако в органических растворителях

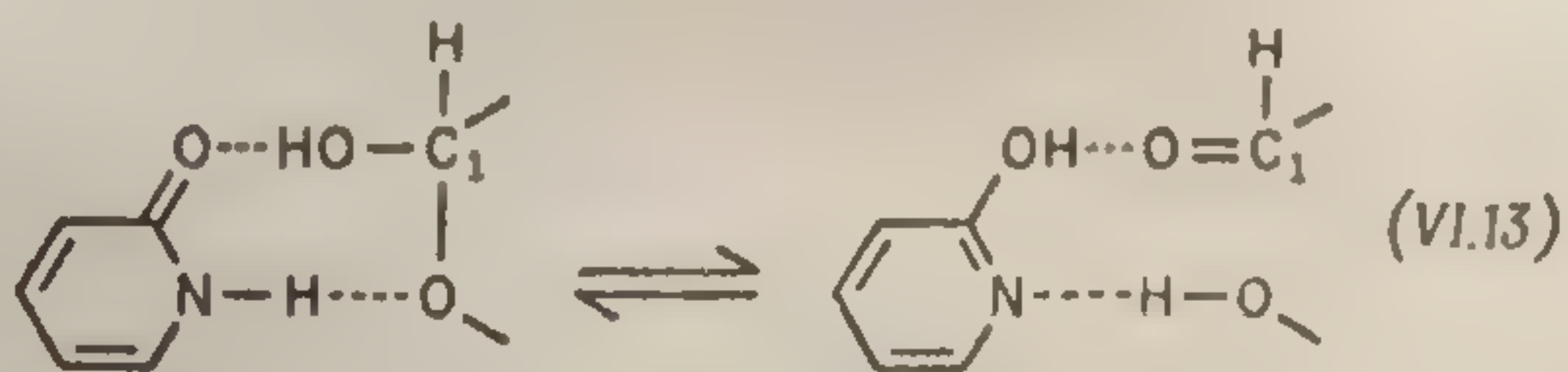


мутаротация производных глюкозы слабо катализируется как основанием (пиридин), так и кислотой (крезол или фенол), и только в присутствии смеси кислоты и основания эта реакция протекает быстро. В растворах бензола зависимость скорости реакции от концентрации каждого из катализаторов (кислоты и основания) подчиняется кинетике первого порядка. Для



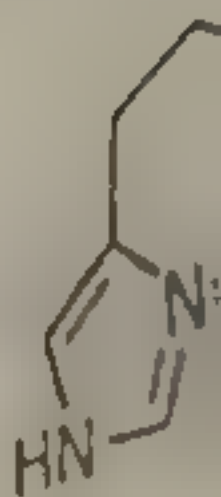
Фиг. 77. Мутаротация тетраметилглюкозы через стадию альдегида с открытой цепью.

объяснения этого явления необходимо допустить сочетанный, или синхронный, механизм, включающий катализ кислотой и основанием. С бифункциональным катализатором, 2-оксипиридином, скорость мутаротации оказывается значительно более высокой:

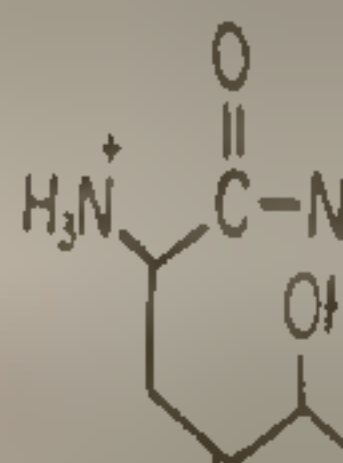


Более того, зависимость скорости реакции от концентрации этого бифункционального катализатора также подчиняется кинетике первого порядка. Таким образом, одна молекула может сочетать и кислотную и основную каталитические функции. Эти данные особенно ин-

тересны в связи  
жест окислитель-  
роактом (3,3-от)



Фиг. 78. Имида

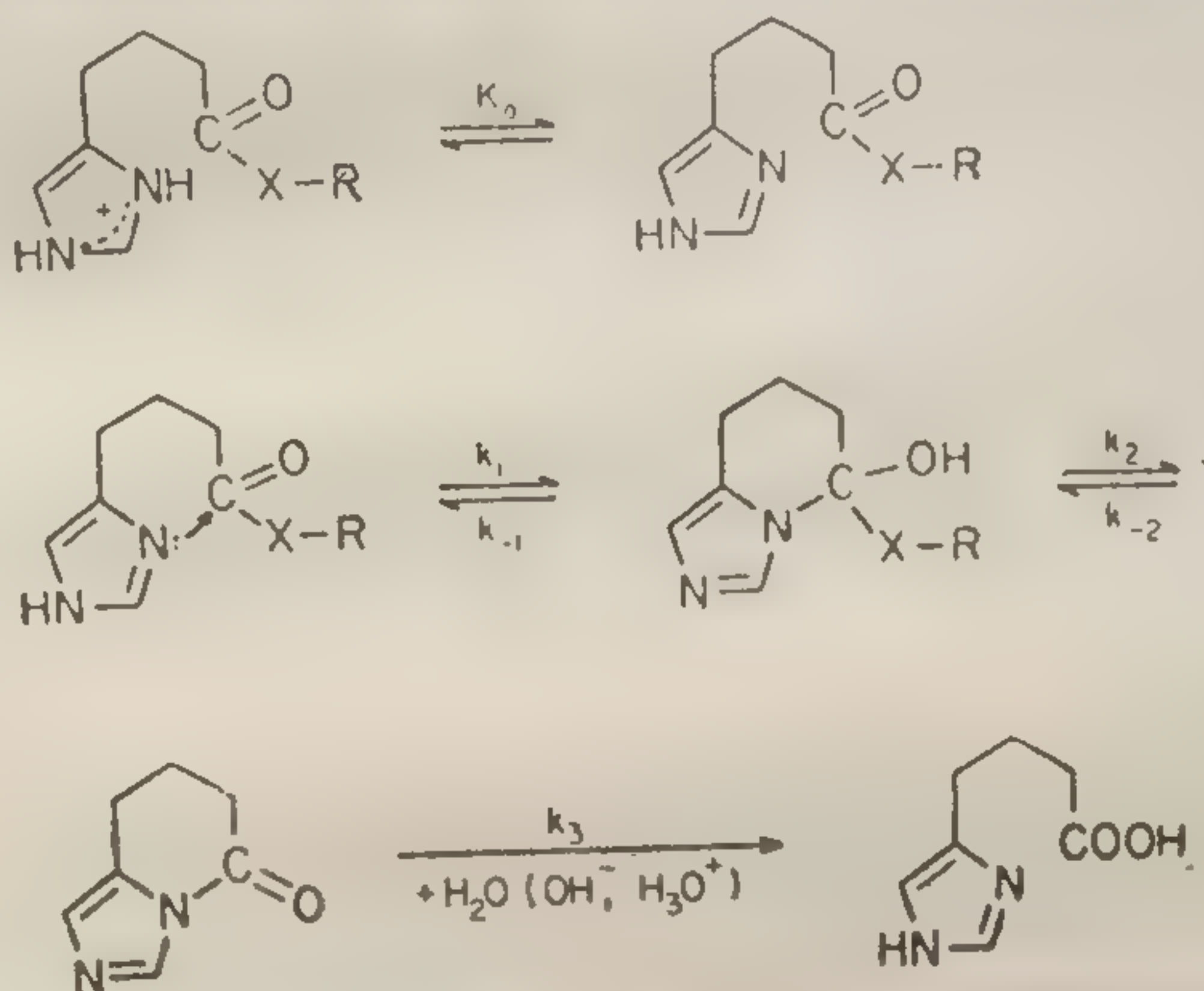


Фиг. 79. Гид

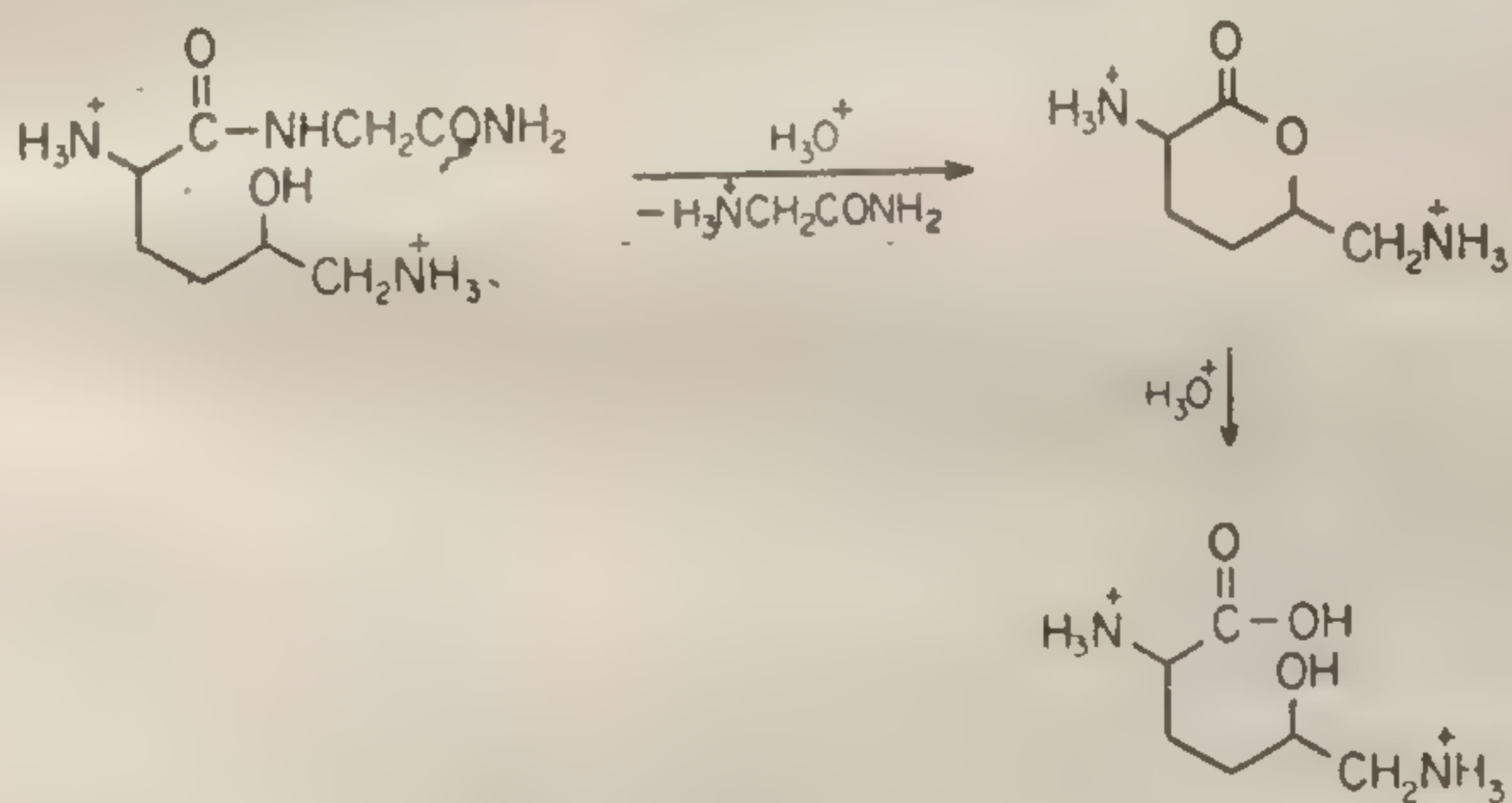
ной группы  
не являются  
тому, из-за  
вующих од  
и кислотно



интересны в связи с тем, что гидроксильная группа снижает основность азота пиридиниевого кольца, а гетероатом (азот) значительно снижает кислотность еноль-



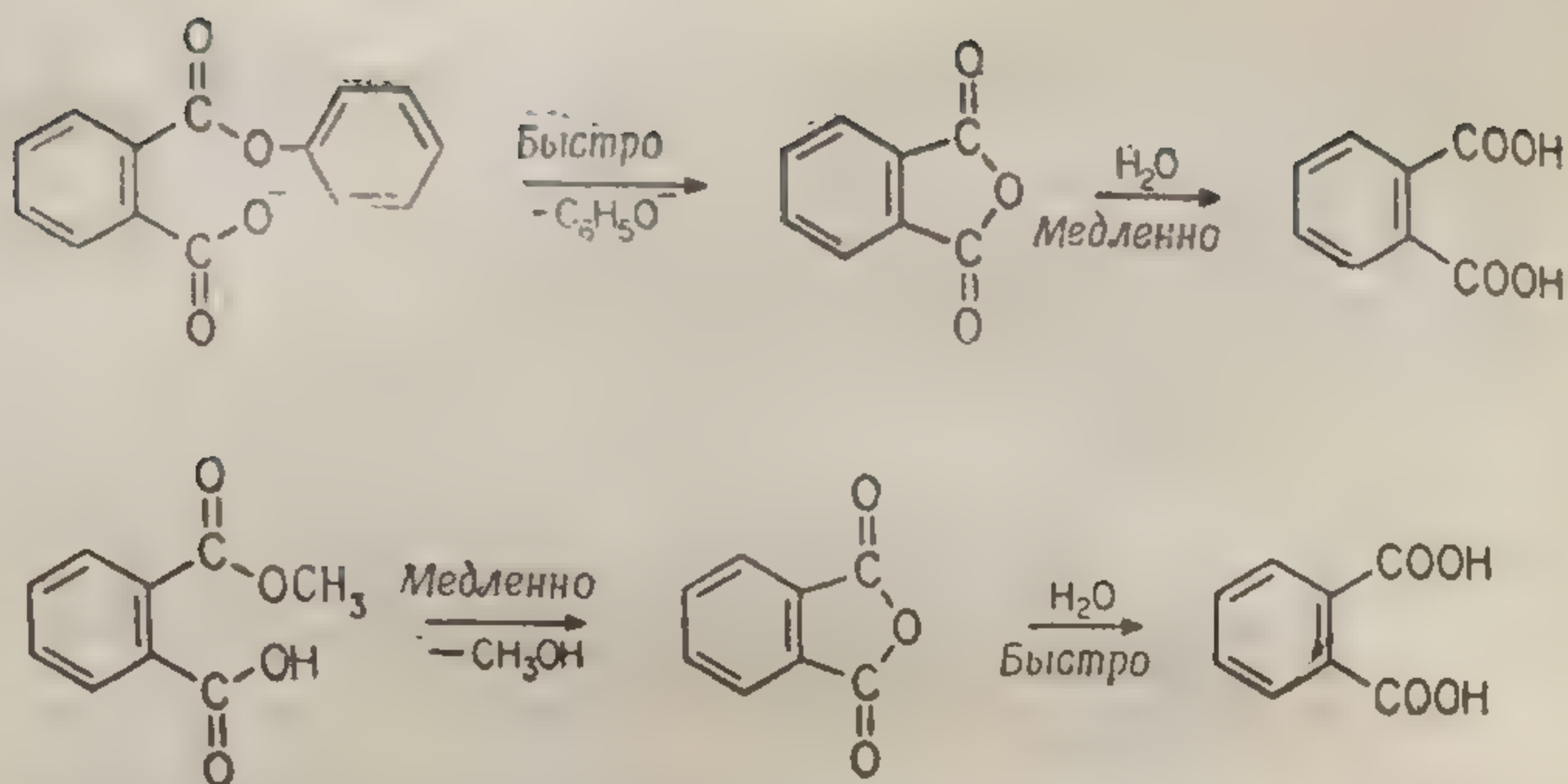
Ф и г. 78. Имидазольный катализ при гидролизе эфиров  $\gamma$ -(4-имидазолил)-масляной кислоты.



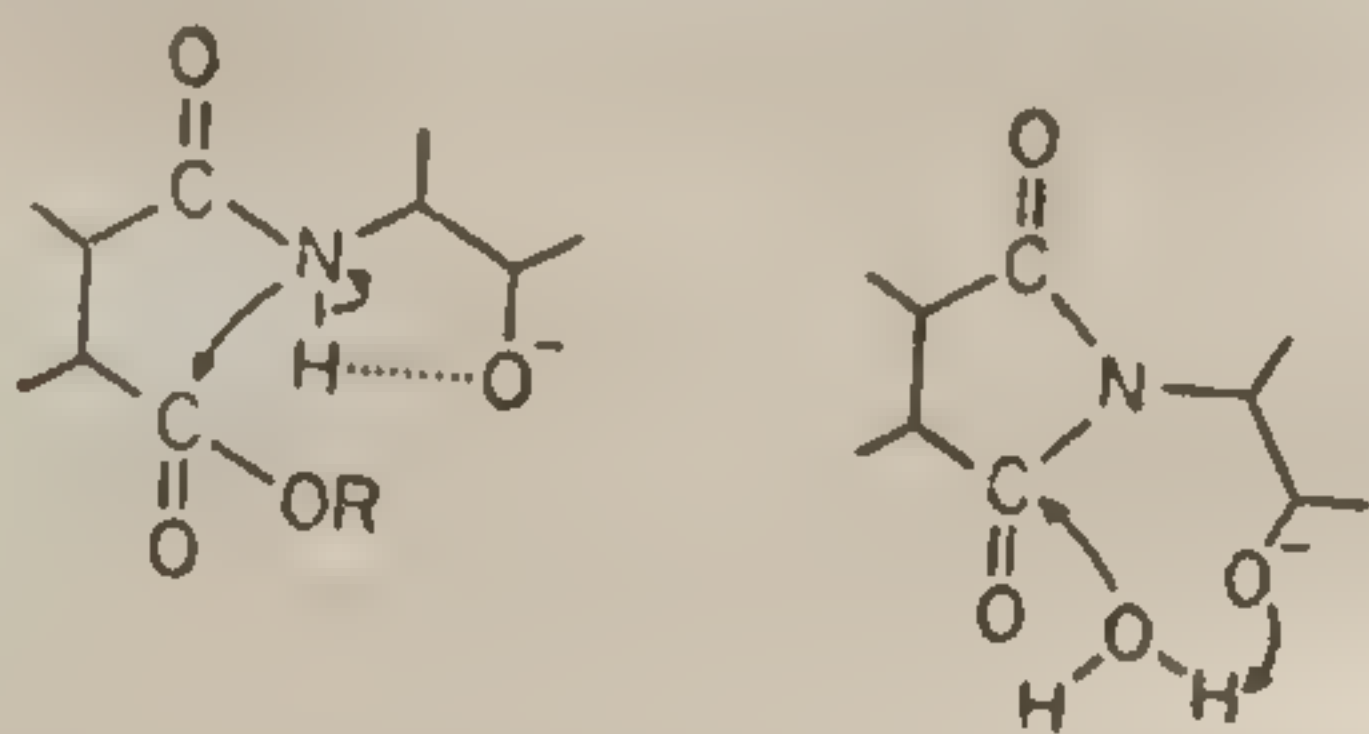
Ф и г. 79. Гидролиз аллооксилизилглицинамида в сильной кислоте.

ной группы. Два других изомера, 3- и 4-оксипиридин, не являются эффективными катализаторами, по-видимому, из-за пространственных ограничений, препятствующих одновременному приближению основного азота и кислотной группы к реакционному центру субстрата.

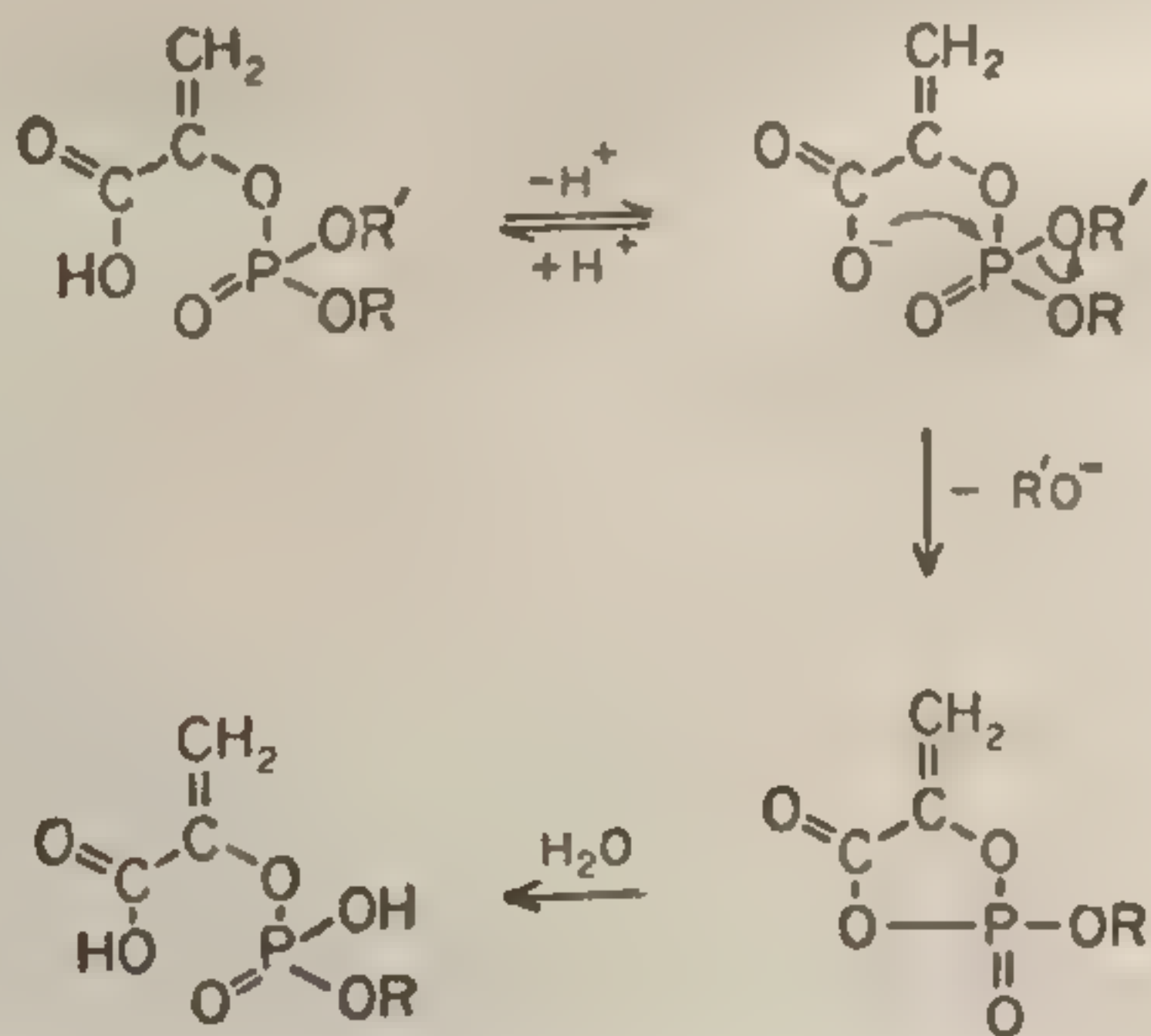




Ф и г. 80. Гидролиз моноэфиров фталевой кислоты, катализируемый карбоксилат-анионом и неионизированной карбоксильной группой.



Ф и г. 81. Участие гидроксильной группы в образовании и гидролизе имидов.



Ф и г. 82. Гидролиз алкилфосфорных эфиров фосфоенолпирувата, катализируемый карбоксилат-анионом.

В у...  
группе реак...  
и фосфорных к...  
рых значительно  
ляриного катали...  
ратить вниман...  
лях постулирует...  
но-электростатич...  
катализ. Для неко...  
реакций известны  
реакции, что даст  
эффективность вну...  
того катализа. В д...  
тализ слишком сла...  
обнаружить, или ж...  
кет по иному пути  
внутримолекулярн...

Отметим два о...  
1. Хотя скоро...  
щественно превл...  
акций, они все ж...  
тативных реакци...  
2. В реакциях  
«активированные»  
реакции в гомоген...  
тически до конц...  
логи» которых  
медленно, очеви...  
помощи уникал...  
катализа. Своес...  
черты механизм...  
нудительно сбли...  
мент-субстратно...  
Рассмотрим  
ции: а) через с...  
ного продукта, и б...  
активации, и б...  
с относительно  
дой из стадий  
(механизм б)



Внутримолекулярный катализ в соединениях, моделирующих ферменты, наиболее детально изучен на примере реакций *сольволиза* производных карбоновых и фосфорных кислот. Некоторые реакции, скорость которых значительно повышена в результате внутримолекулярного катализа, показаны на фиг. 78—82. Следует обратить внимание на то, что во всех приведенных реакциях постулируется механизм, сочетающий нуклеофильно-электрофильный и (или) общий кислотно-основной катализ. Для некоторых из этих внутримолекулярных реакций известны соответствующие *межмолекулярные* реакции, что дает возможность сравнить относительную эффективность внутримолекулярного и межмолекулярного катализа. В других случаях межмолекулярный катализ слишком слаб, для того чтобы его можно было обнаружить, или же межмолекулярная реакция протекает по иному пути. В табл. 16 сопоставлены некоторые внутримолекулярные и межмолекулярные реакции.

Отметим два обстоятельства:

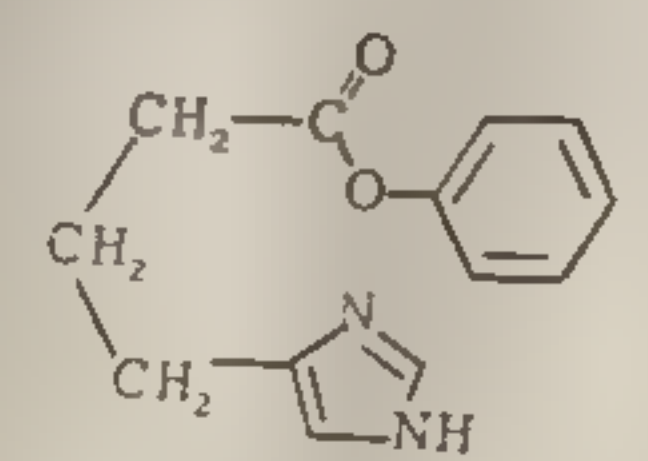
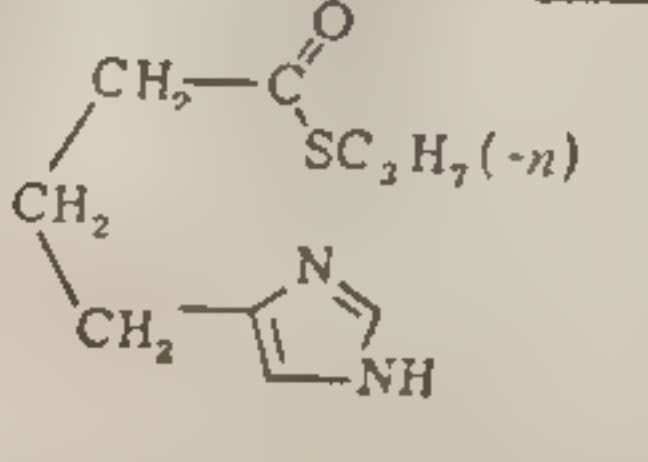
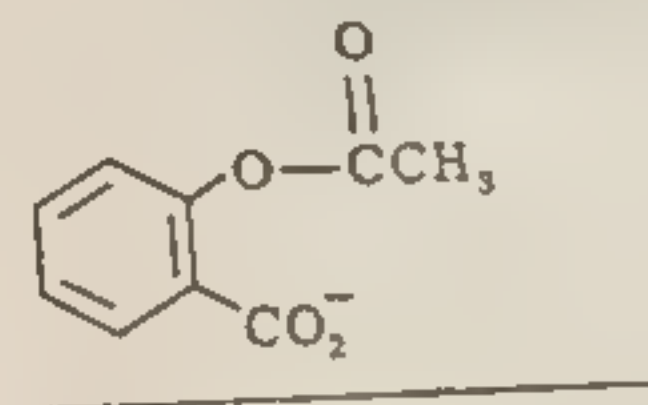
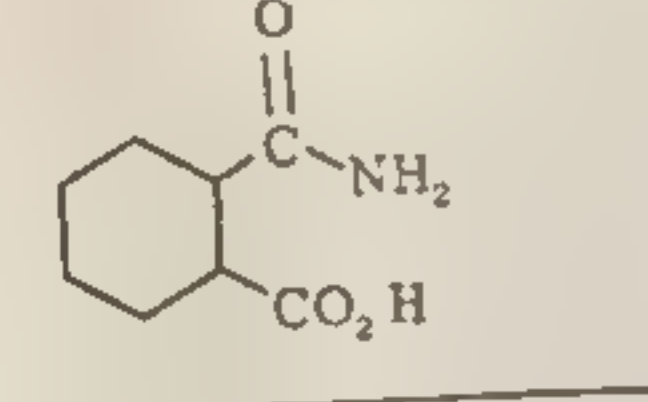
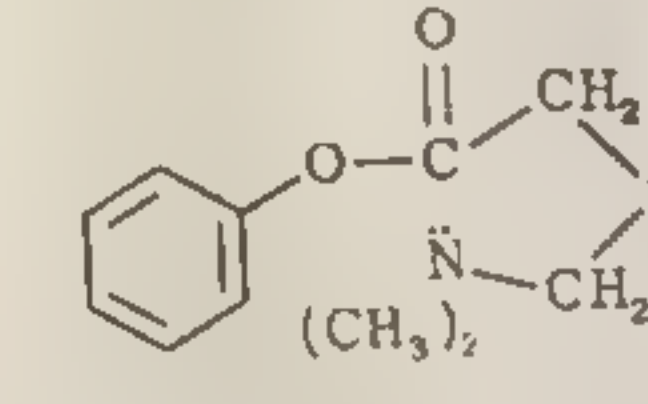
1. Хотя скорости внутримолекулярных реакций существенно превышают скорости межмолекулярных реакций, они все же значительно ниже скоростей ферментативных реакций.

2. В реакциях, приведенных в табл. 16, участвуют «активированные» функциональные группы, т. е. эти реакции в гомогенных растворах легко протекают практически до конца. Те реакции, «межмолекулярные аналоги» которых протекают в гомогенных растворах медленно, очевидно, осуществляются ферментами при помощи уникальных механизмов внутримолекулярного катализа. Своеобразие этих реакций отражает особые черты механизма, при котором реакционный центр припудительно сближен с каталитическими группами в фермент-субстратном комплексе.

Рассмотрим два возможных пути протекания реакции: а) через стадию образования одного промежуточного продукта, характеризующуюся высокой энергией активации, и б) через ряд промежуточных продуктов с относительно небольшой энергией активации на каждой из стадий (фиг. 83). В случае сложного механизма (механизм б) на каждой из стадий будет проявляться



Сравнение ряда реакций ацильного переноса, осуществляющихся в результате внутримолекулярного или межмолекулярного катализа по сходным механизмам

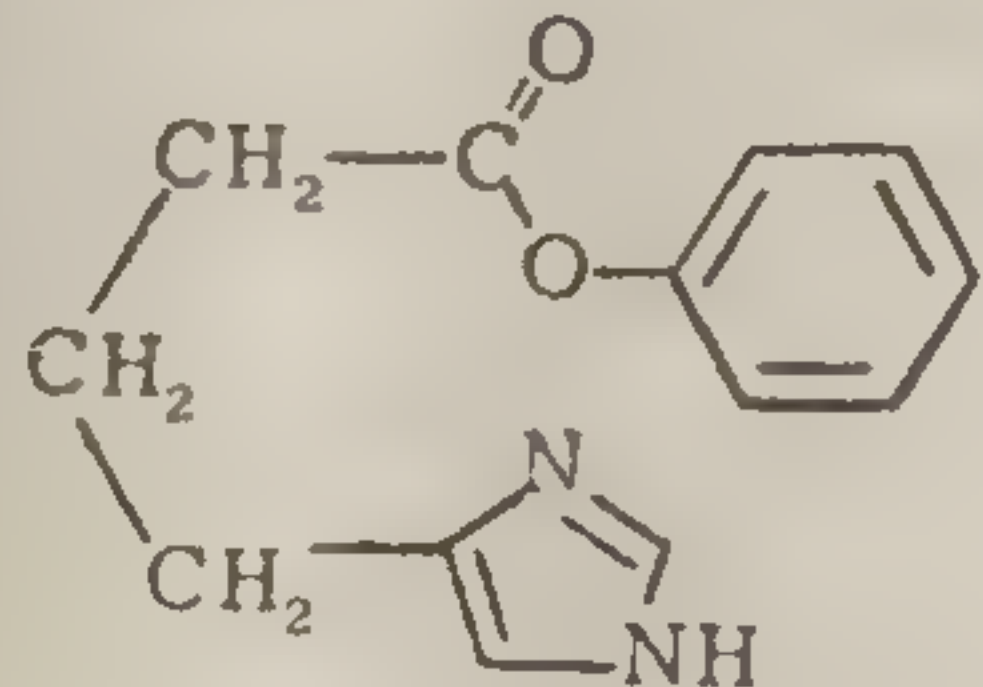
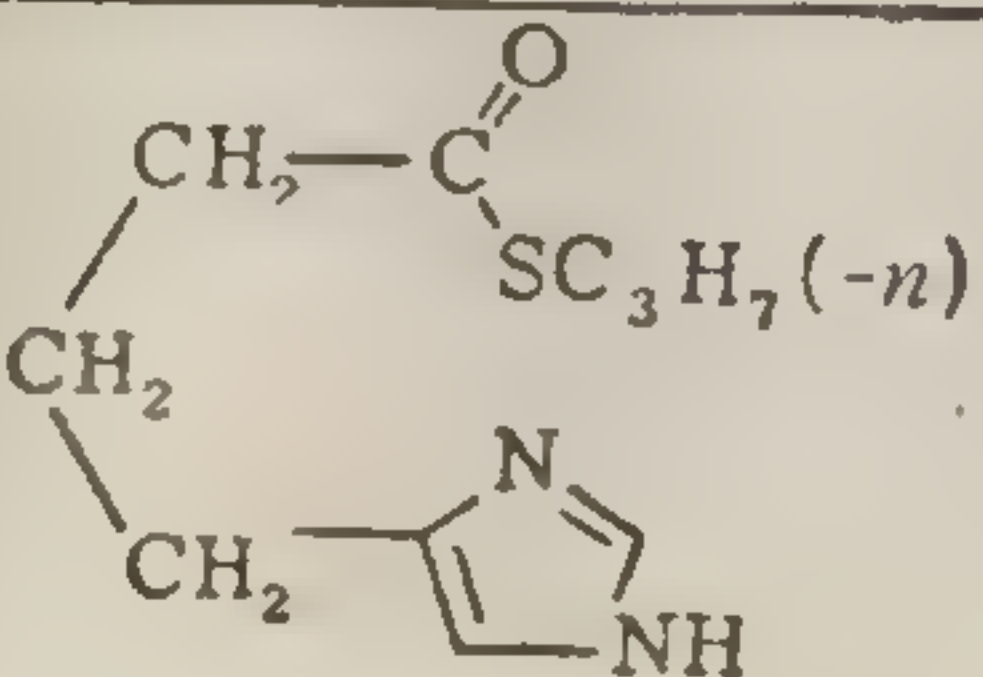
Реакция	Внутримолекулярная модель	$\left(\frac{k_{\text{вн}}}{k_{\text{меж}}}\right)^{1)}$
$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{OC}_6\text{H}_5 + \text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C} \end{array} \text{N-H} \xrightarrow{\text{Медленно}} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C} \end{array} \text{N} + \text{C}_6\text{H}_5\text{OH} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{Быстро}}$		30
$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SR} + \text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C} \end{array} \text{N-H} \xrightarrow{\text{Медленно}} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C} \end{array} \text{N} + \text{RSH} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{Быстро}}$ <p><math>(\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5, n\text{-C}_4\text{H}_9)</math></p>		100
$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3 \xrightarrow[\text{CH}_3\text{CO}_2^-]{\text{H}_2\text{O}} \text{C}_6\text{H}_5\text{OH} + \text{CH}_3\text{CO}_2^- + \text{H}^+$		8
$\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \xrightarrow[\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}]{\text{H}_2\text{O}} \text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2\text{H} + \text{NH}_3$		70
$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3 \xrightarrow[(\text{CH}_3)_3\text{N}]{\text{H}_2\text{O}} \text{C}_6\text{H}_5\text{OH} + \text{CH}_3\text{CO}_2^- + \text{H}^+$		100

<sup>1)</sup> Это отношение выражает ту концентрацию катализатора, которая была бы необходима при межмолекулярном катализе для достижения скорости, наблюдаемой при внутримолекулярной реакции.

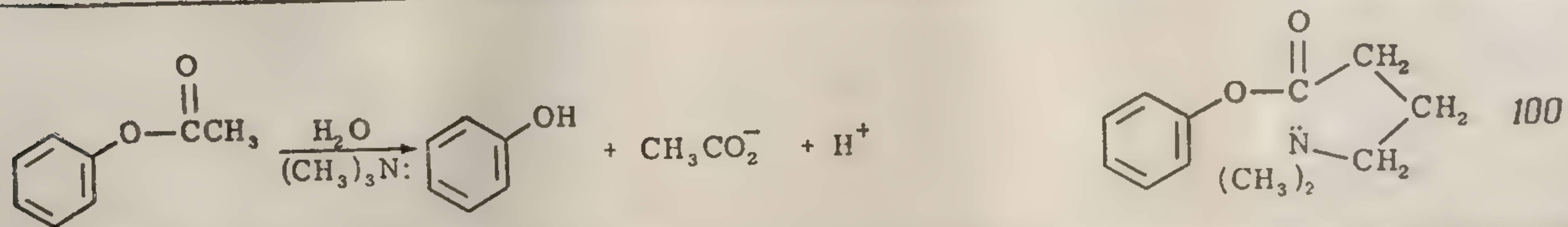
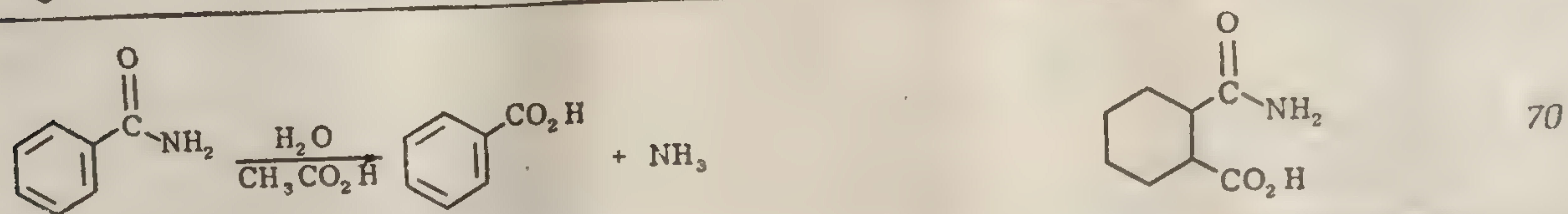
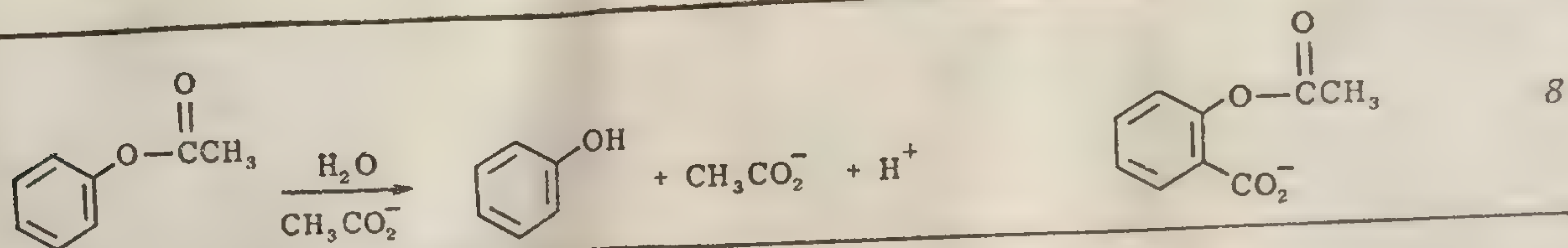


Таблица 16

Сравнение ряда реакций ацильного переноса, осуществляющихся в результате внутримолекулярного или межмолекулярного катализа по сходным механизмам

Реакция	Внутримолекулярная модель	$\left(\frac{k_{ан}}{k_{меж}}\right)^{1)}$
$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{OC}_6\text{H}_5 + \text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \diagup \\ \text{N-H} \end{array} \xrightarrow{\text{Медленно}} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \diagup \\ \text{N} \end{array} + \text{C}_6\text{H}_5\text{OH} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{Быстро}}$		30
$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SR} + \text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \diagup \\ \text{N-H} \end{array} \xrightarrow{\text{Медленно}} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \diagup \\ \text{N} \end{array} + \text{RSH} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{Быстро}}$ <p><math>(\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5, n\text{-C}_4\text{H}_9)</math></p>		100

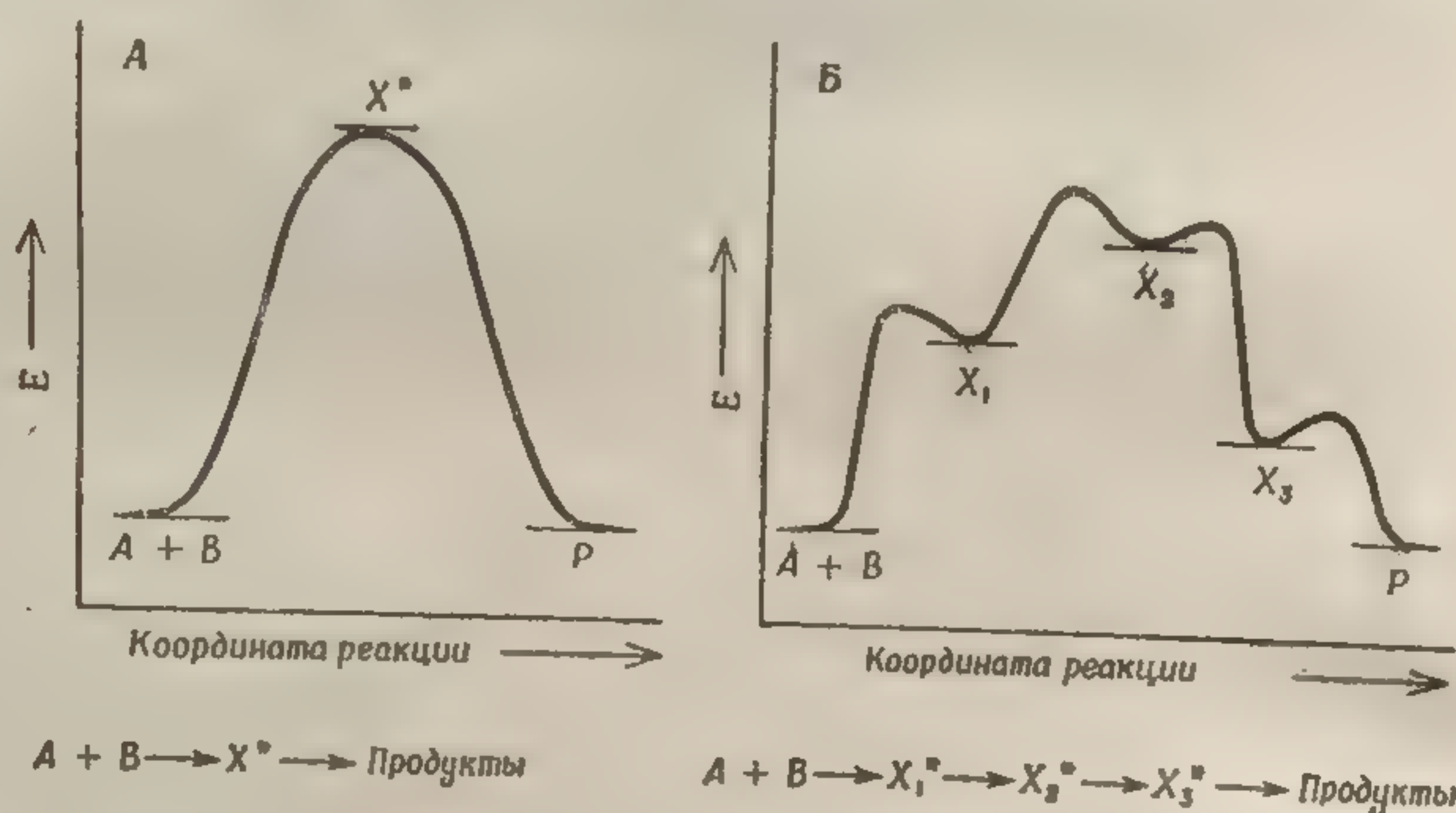




1) Это отношение выражает ту концентрацию катализатора, которая была бы необходима при межмолекулярном катализе для достижения скорости, наблюдаемой при внутримолекулярной реакции.



тенденция к протеканию реакции в обратном направлении вследствие неблагоприятных энтропийных условий, из-за ограничений, накладываемых на поступательные и вращательные движения субстрата и катализатора в «жестком» комплексе. Хотя барьеры, обусловленные изменением внутренней энергии (электронные барьеры), могут быть пониженными в сложном механизме (типа б), неблагоприятные энтропийные условия на



Фиг. 83. График энергия—координата реакции для одностадийной (А) и для многостадийной (Б) реакций.

этом пути будут обесценивать создаваемое этим обстоятельством преимущество, что должно снижать вероятность многостадийного пути реакции. Иначе обстоит дело при образовании «закрепленного», но термодинамически стабильного фермент-субстратного комплекса: при этом невыгодной энтропийной ситуации не возникает. Поэтому при внутримолекулярном и ферментативном катализе более выгодным может оказаться путь, состоящий из ряда промежуточных стадий, каждая с относительно низкой энергией активации. Как будет видно из дальнейшего, подобные многостадийные механизмы часто встречаются при ферментативном катализе.

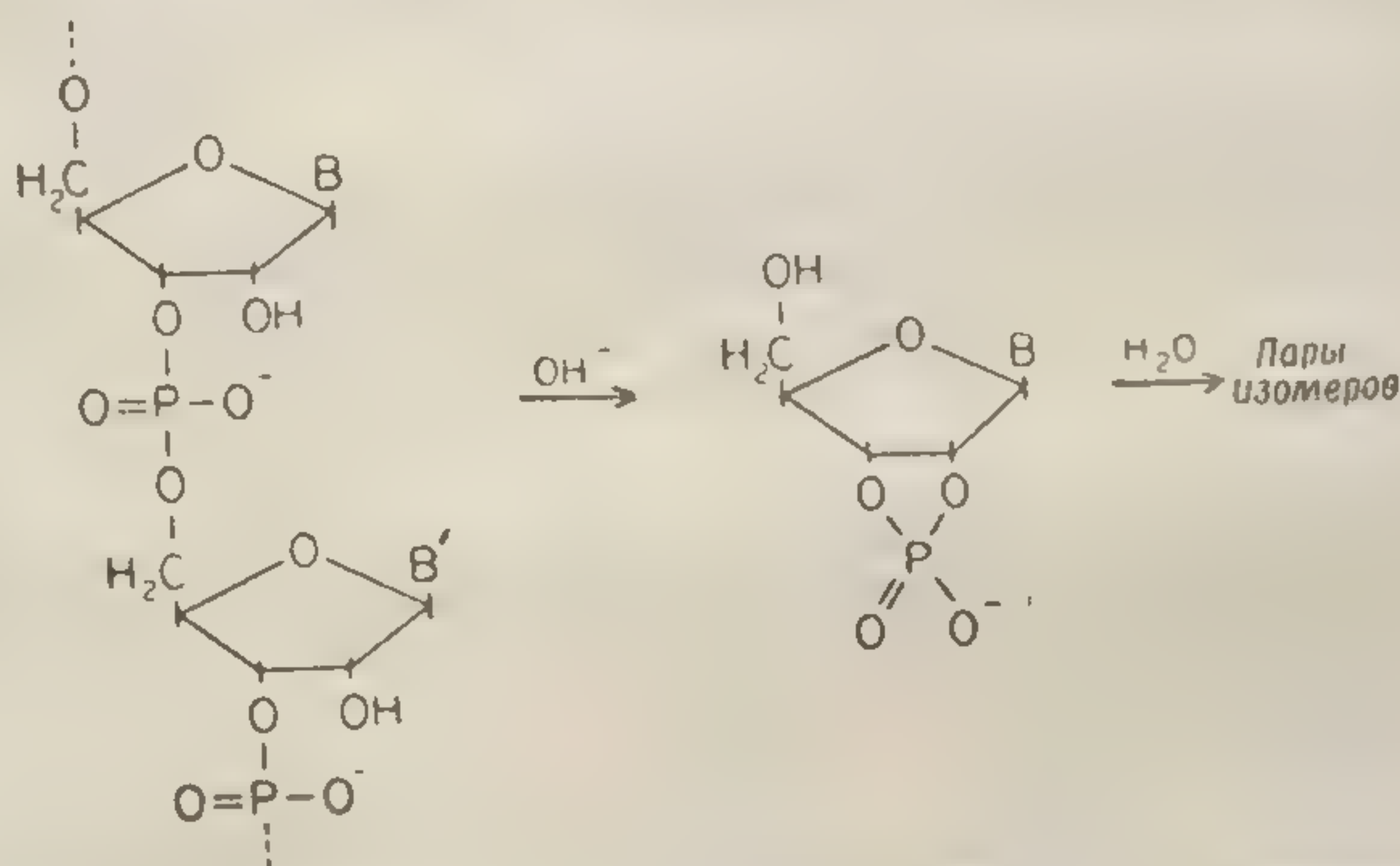
До сих пор мы ограничивались рассмотрением каталитических механизмов, в которых действуют функциональные группы, являющиеся аналогами боковых цепей аминокислот, входящих в состав белка. Некоторые из

Фиг. 84. Уг

находящиеся  
такого рода  
кислот (фиг  
группа субс  
лизированной  
ляемом осно  
нять, почему  
и расщепле  
выше, чем с  
нуклеиновых  
2'-гидроксил  
В больши  
составляющ  
электронно  
а другие фу  
себе два ти



таких боковых цепей могут функционировать в качестве кислотно-основных катализаторов. Однако ряд процессов образования и разрыва связей, а также процессов переноса электронов в ходе различных биохимических превращений невозможно объяснить только участием боковых цепей аминокислот. Нередко в этих реакциях участвуют соседние функциональные группы,



Фиг. 84. Участие соседней карбоксильной группы в гидролизе рибонуклеиновой кислоты.  
В — пурин или пиримидин.

находящиеся в самой молекуле субстрата. Примером такого рода может служить гидролиз рибонуклеиновых кислот (фиг. 84); в этом случае соседняя гидроксильная группа субстрата участвует в реакции гидролиза, катализируемой ферментом (а также в катализе, осуществляемом основанием или кислотой). Это позволяет понять, почему как *in vivo*, так и *in vitro* скорости синтеза и расщепления рибонуклеиновых кислот значительно выше, чем соответствующие скорости для дезоксирибонуклеиновых кислот (у которых отсутствует смежная 2'-гидроксильная функциональная группа).

В большинстве очень быстрых химических процессов, составляющих метаболизм, донорами и акцепторами электронов являются не боковые цепи аминокислот, а другие функциональные группы. Можно представить себе два типа таких каталитических групп: 1) новые



структуры, возникающие в результате химического взаимодействия между боковыми цепями аминокислот ферментного белка, и 2) функциональные группы других молекул (не боковых цепей аминокислот), прочно связанных с белком и закрепленных в определенном положении в активном центре.

Существование каталитических групп первого типа неоднократно постулировалось, однако убедительно показать его ни разу не удалось. Группы второго типа принадлежат кофакторам, коферментам и простетическим группам; они участвуют в ферментативном катализе очень большого числа биохимических реакций. Каталитические механизмы, в которых участвуют такие кофакторы, рассматриваются в следующей главе.

В данной главе, а также в гл. VII сопоставляются реакции, катализируемые ферментами, и сходные реакции, катализируемые малыми молекулами. Показано, что энтропийные эффекты при полифункциональном внутримолекулярном катализе могут (в благоприятных случаях) приводить к значительному повышению скорости реакции, а также обуславливать существование механизмов, неосуществимых при межмолекулярном катализе. Кроме того, показано, что благодаря принудительному внутримолекулярному расположению групп суммарная реакция может протекать через ряд дискретных химических превращений, причем барьер свободной энергии для перехода одного промежуточного соединения в другое всегда значительно ниже, чем общий энергетический барьер для прямого химического превращения в межмолекулярном процессе. Принимая во внимание эти соображения, можно качественно объяснить высокие скорости реакций, катализируемых ферментами. При количественном сравнении (сопоставлении удельных констант скоростей) скорости модельных реакций, катализируемых небольшими полифункциональными молекулами, почти всегда значительно уступают скоростям ферментативных реакций, специфичных в отношении субстрата.

Одна из еще не упоминавшихся особенностей, отличающих ферментативные реакции от других каталитических реакций, определяется способностью фермент-

по э бел...  
Такого рода к...  
шие в ходе к...  
тивном цент...  
разобщенных...  
существовавш...  
нец, в повыше...  
рательному с...  
перестройки...  
ного центра...  
ному изменен...  
центра, так и...  
ментальное о...  
изменений в...  
ставляет собой...  
подобные изм...  
тализированных...  
сделать выбор...  
формационных...  
с нефермента...  
вестно больш...  
нения в ко...  
роль при дей...  
тов. В гл. VI...  
рода.

Bruice T. C.,  
New York  
Breslow R.,  
1965.  
Bender M. L.,  
Comparati...  
Stotz E. H.,  
Gould E. S.,  
Rinehart...  
Hine J., Phys...  
York, 1966.  
Bell R. P., Th...  
New York  
Bruice T. C.,  
Apparent...  
J. Am. Ch...  
Eigen M., H...  
Adv in P...



ного белка претерпевать конформационные изменения. Такого рода конформационные изменения, происходящие в ходе катализа, могут вызывать изменения в активном центре, выражающиеся в сближении ранее разобщенных функциональных групп, в разъединении существовавших каталитических группировок и, наконец, в повышении или понижении способности к избирательному связыванию субстрата. «Энергетические» перестройки на участке, далеко отстоящем от активного центра, могут, очевидно, приводить к существенному изменению как трехмерной структуры активного центра, так и его функциональных свойств. Экспериментальное обнаружение подобных конформационных изменений в ходе каталитического акта обычно представляет собой нелегкую задачу. Более того, поскольку подобные изменения не происходят при реакциях, катализируемых малыми молекулами, нет возможности сделать выбор между предполагаемыми типами конформационных изменений, основываясь на аналогиях с неферментативными системами. Между тем уже известно большое число фактов, указывающих, что изменения в конформации белка играют существенную роль при действии по крайней мере некоторых ферментов. В гл. VIII мы обсудим несколько примеров такого рода.

## ЛИТЕРАТУРА

- Bruice T. C., Benkovic S., *Bioorganic Mechanisms*, Benjamin, New York, Vols. 1 and 2, 1966.
- Breslow R., *Organic Reaction Mechanisms*, Benjamin, New York, 1965.
- Bender M. L., Breslow R., *Mechanisms of Organic Reactions*, in *Comparative Biochemistry*, Vol. 2, p. 1 (Florkin M., and Stotz E. H., editors), Elsevier, Amsterdam, 1962.
- Gould E. S., *Mechanisms and Structure in Organic Chemistry*, Holt, Rinehart and Winston, New York, 1959.
- Hine J., *Physical Organic Chemistry*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1962.
- Bell R. P., *The Proton in Chemistry*, Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, 1961.
- Bruice T. C., Schmir G., *The Influence of Mechanism on the Apparent  $pK_a$  of Participating Groups in Enzymic Reactions*, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4553 (1959).
- Eigen M., Hammes G. G., *Elementary Steps in Enzyme Kinetics*, *Adv. in Enzymol.*, 25, 1 (1963).



## ГЛАВА VII

### КОФЕРМЕНТЫ И КОФАКТОРЫ. МОДЕЛИ ФЕРМЕНТОВ И МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕЙСТВИЯ

Несмотря на то что число различных биохимических реакций огромно, разнообразие типов механизмов этих реакций не столь велико. Любой механизм, предлагаемый для реакций, катализируемых ферментами, должен находиться в согласии с высокими числами оборотов, наблюдаемыми в эксперименте. Этими высокими скоростями и объясняется (во всяком случае частично) то обстоятельство, что число типов ферментативных механизмов оказывается ограниченным. Хорошо известно, что в катализе разнообразных реакций, протекающих с участием множества различных ферментов, участвуют определенные коферменты или кофакторы. Эта глава посвящена в основном рассмотрению механизмов, с помощью которых определенный кофермент или кофактор может служить посредником во многих разных реакциях.

Термины *кофермент*, *кофактор* и *простетическая группа* издавна используются в биохимической литературе для описания двух типов ферментативных функций. Часто все три термина применяют как синонимы. По-видимому, полезнее всего определить эти *сокатализаторы* в соответствии с каталитическими функциями, которые они выполняют:

1. *Сокатализаторы, входящие в состав активного центра, которые регенерируются по завершении каждого цикла реакции:*



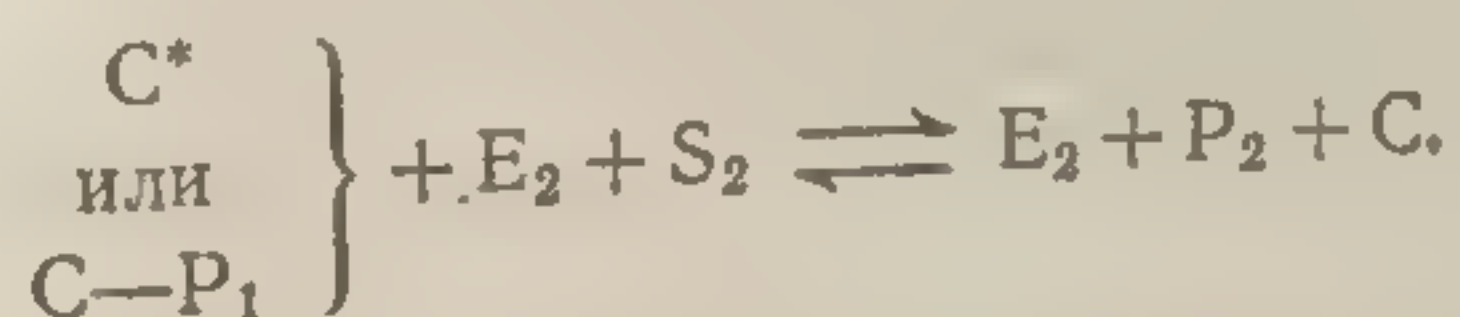
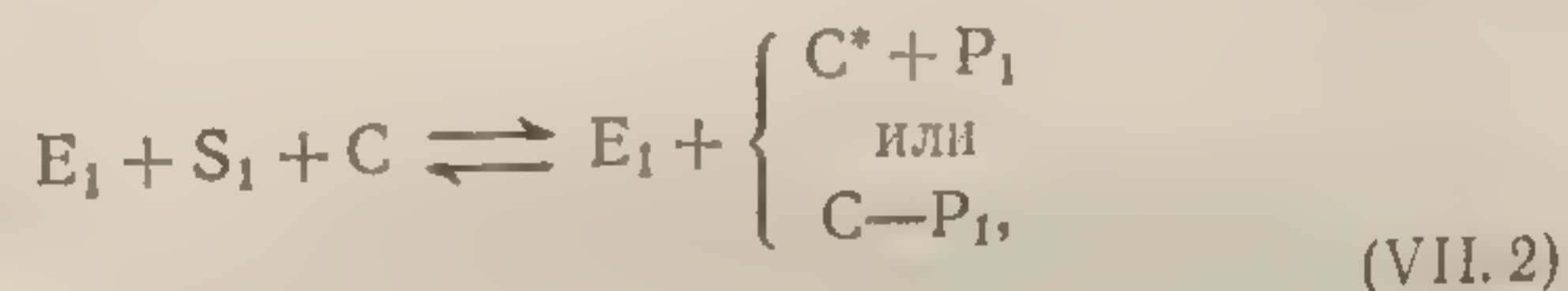
В процессе этого  
тарыми участками  
Обычно сокатализ  
ратимо) от ферме  
чески неактивных  
заторы обычно  
примерами ката  
реакции с участ  
таминпирозосфа  
2. Сокатализат  
стратом образуют  
акциях такого ти  
в каждом цикле  
словами, кофакто  
том активного це  
гентом. Такие к  
ментами. Различ  
очень тонкое и ч  
тер. В ходе с  
in vivo необрати  
исходит — кофер  
ферментативных  
вращения (C\*)

Следовательно,  
ности реакций э  
ционноспособно  
ферментативно  
чая кофермент  
онноспособного  
дукта к новому  
циях с участ  
в других он сл



В процессах этого типа сокатализатор (С) вместе с некоторыми участками полипептида образует активный центр. Обычно сокатализатор может быть отдиссоциирован (обратимо) от ферментного белка с образованием каталитически неактивных компонентов ( $E + C$ ). Такие сокатализаторы обычно называются *кофакторами*. Хорошими примерами катализа этого типа служат ферментативные реакции с участием кофакторов пиридоксальфосфата и тиаминпирофосфата.

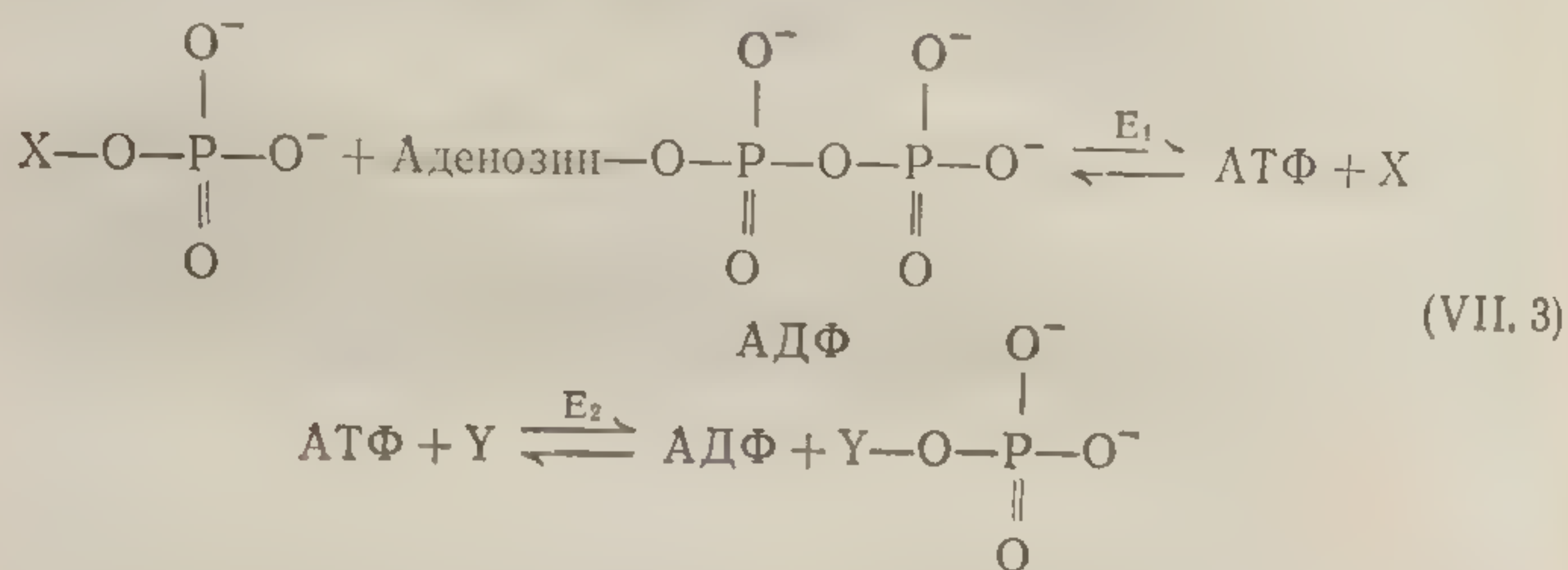
2. *Сокатализаторы, которые в ходе реакции с субстратом образуют новое химическое соединение.* В реакциях такого типа один эквивалент сокатализатора в каждом цикле превращается в новый продукт; иными словами, кофактор является не стабильным компонентом активного центра (*простетической группой*), а реагентом. Такие кофакторы обычно называются *коферментами*. Различие между субстратом и коферментом очень тонкое и часто имеет чисто семантический характер. В ходе суммарного метаболического процесса *in vivo* необратимого расходования кофермента не происходит — кофермент регенерируется за счет других ферментативных реакций, в которых продукт его превращения ( $C^*$ ) используется в качестве реагента:



Следовательно, функция кофермента в последовательности реакций этого типа заключается в переносе реакционноспособного промежуточного продукта от одного ферментативного процесса к другому. В некоторых случаях кофермент выступает в роли переносчика реакционноспособного (сравнительно) промежуточного продукта к новому месту реакции (как, например, в реакциях с участием кофермента А, описанных ниже), в других он служит попеременно то окислителем, то вос-



становителем в двух различных ферментативных реакциях (например, в реакциях, использующих пиридиновые нуклеотиды и флавиновые коферменты). Классификация коферментов в соответствии с этим последним критерием в значительной мере условна; так, например, фосфорилирование и дефосфорилирование адениннуклеотидов [уравнение (VII.3)] сопряжено со многими ферментативными процессами:



Адениннуклеотиды могут быть классифицированы как коферменты реакций фосфорилирования, в которых они участвуют, на том же основании, на котором пиридиновые нуклеотиды считаются коферментами соответствующих реакций биологического окисления — восстановления<sup>1</sup>.

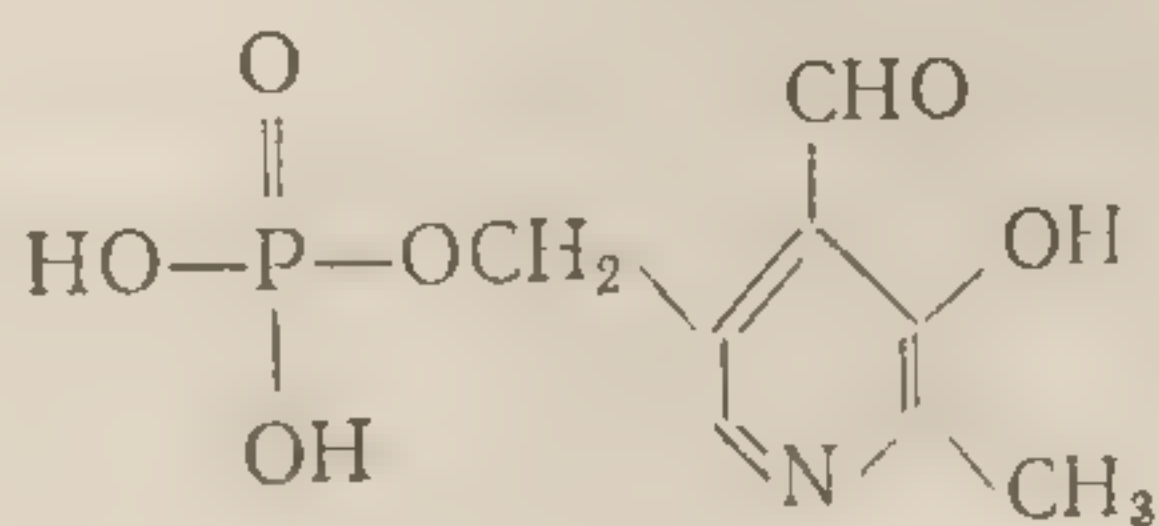
Для всех реакций, протекающих с участием коферментов и кофакторов, характерно высокое сродство фермента к сокатализатору и, следовательно, высокая степень геометрической пригнанности различных реакционноспособных центров — каталитических групп фер-

<sup>1</sup> Единой общепринятой системы классификации органических кофакторов ферментативного катализа («сокатализаторов», по выражению автора) пока не существует. По этому вопросу авторы трудов по энзимологии и учебников биохимии придерживаются самых различных, подчас диаметрально противоположных точек зрения; терминология, которой пользуется автор этой книги, далеко не самая логичная и последовательная. (См. статью «Коферменты» в «Большой медицинской энциклопедии», т. 14, стр. 166, и гл. VI в кн. «Ферменты» под ред. А. Е. Браунштейна в серии «Основы молекулярной биологии», изд-во «Наука», 1964.) — Прим. ред.



мента, функциональных групп сокатализатора и реакционного центра (центров) субстрата. Механизм действия некоторых коферментов и кофакторов изучен весьма обстоятельно. В других случаях о деталях механизма в настоящее время почти ничего не известно. Поскольку наша основная цель состоит не в том, чтобы дать полное описание всего промежуточного обмена веществ, мы ограничимся рассмотрением некоторых избранных примеров, для которых детали механизма известны. Не следует поэтому, основываясь на нижеследующем обсуждении, делать какие-либо выводы об относительной важности или разнообразии функций одного кофермента или кофактора по сравнению с другими.

### 1. КАТАЛИЗ С УЧАСТИЕМ ПИРИДОКСАЛЬФОСФАТА



Пиридоксальфосфат

Из реакций, протекающих с участием кофакторов, реакции, в которых участвует пиридоксальфосфат, изучены особенно хорошо. Этот кофактор необходим для целого ряда, казалось бы, несходных по типу ферментативных реакций. Некоторые из них приведены в табл. 17.

Интерес к реакциям, в которых участвует пиридоксальфосфат, возник в связи с тем, что многие из них катализируются этим кофактором в отсутствие фермента. Однако скорости реакций в отсутствие фермента намного меньше (примерно в  $10^6$  раз). Для таких неферментативных реакций было продемонстрировано образование метастабильных промежуточных продуктов и была частично установлена последовательность промежуточных стадий, изображенная на фиг. 85. Отметим, что эта последовательность реакций включает



Типичные катализируемые ферментами реакции аминокислот, требующие участия пиридоксальфосфата

Тип фермента	Типичная реакция
Трансаминаза	$\begin{array}{c} \text{RCCO}_2^- + \text{R}'\text{CHCO}_2^- \rightleftharpoons \text{RCHCO}_2^- + \text{R}'\text{CCO}_2^- \\ \parallel \quad \quad \quad   \quad \quad \quad \parallel \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$
Рацемаза	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{R} \text{---} \text{C} \text{---} \text{CO}_2^- \\   \\ \text{H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{H} \text{---} \text{C} \text{---} \text{CO}_2^- \\   \\ \text{R} \end{array}$
$\alpha$ -Декарбоксилаза	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{RCH} \text{---} \text{CO}_2^- \end{array} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCH}_2\text{NH}_3^+ + \text{HCO}_3^-$
$\beta$ -Декарбоксилаза	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ ^-\text{O}_2\text{C} \text{---} \text{CH}_2\text{CH} \text{---} \text{CO}_2^- \end{array} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{CH}_3\text{CH} \text{---} \text{CO}_2^- \end{array} + \text{HCO}_3^-$
$\beta$ -ОН-десмолаза (альдолаза)	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{RCH} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CO}_2^- \\   \\ \text{OH} \end{array} \rightleftharpoons \text{R} \text{---} \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{H} \end{array} + \text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CO}_2^-$
Ферменты конденсации глицина (и серина)	$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CO}_2^- + \text{RC} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{SKoA}^1) \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{RC} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CO}_2^- \\    \quad   \\ \text{O} \quad \text{NH}_3^+ \end{array} + \text{KoASH}$
$\alpha,\beta$ -Элиминирование (X — полярный заместитель)	$\begin{array}{c}   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{CHCO}_2^- \\   \quad   \\ \text{X} \quad \text{NH}_3^+ \end{array} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \begin{array}{c}   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{C} \text{---} \text{CO}_2^- \\   \quad    \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array} + \text{HX} + \text{NH}_4^+$
$\beta$ -Конденсация (синтазы)	$\text{Indole} + \begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{HOCH}_2\text{CH} \text{---} \text{CO}_2^- \end{array} \rightarrow \text{Tryptophan} + \text{H}_2\text{O}$

1) Ацилкофермент А (см. разд. 3).

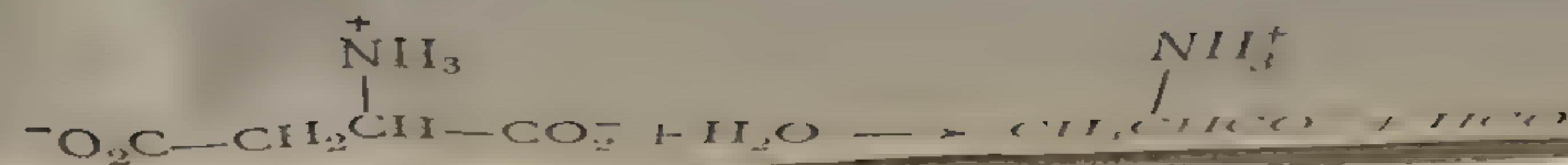


Таблица 17

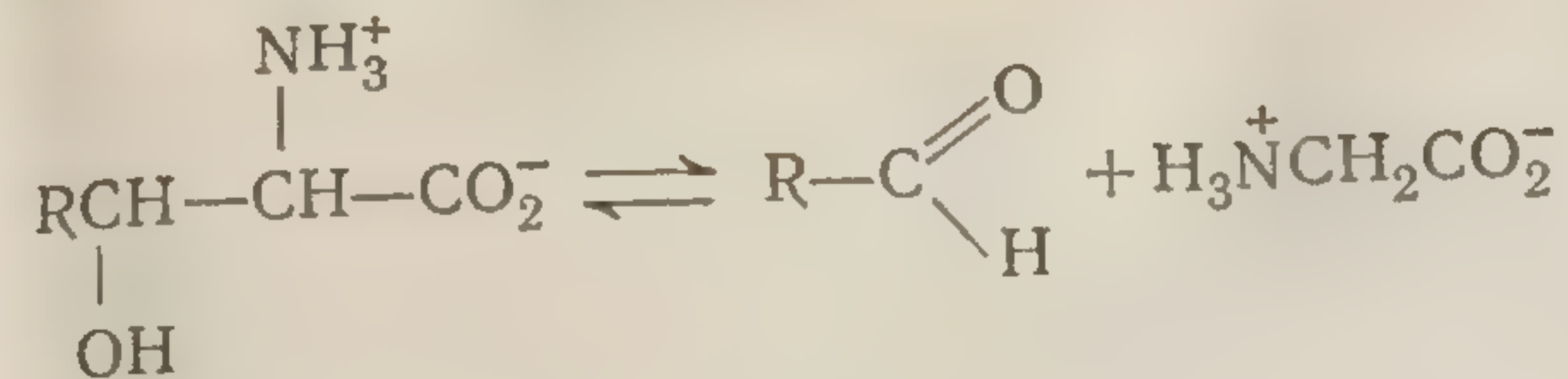
Типичные катализируемые ферментами реакции аминокислот, требующие участия пиридоксальфосфата

Тип фермента	Типичная реакция
Трансаминаза	$\begin{array}{c} \text{RCCO}_2^- + \text{R}'\text{CHCO}_2^- \rightleftharpoons \text{RCHCO}_2^- + \text{R}'\text{CCO}_2^- \\ \parallel \quad \quad \quad   \quad \quad \quad \parallel \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$
Рацемиза	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{NH}_3^+ \\   \quad \quad \quad   \\ \text{R} \text{---} \text{C} \text{---} \text{CO}_2^- = \text{H} \text{---} \text{C} \text{---} \text{CO}_2^- \\   \quad \quad \quad   \\ \text{H} \quad \quad \quad \text{R} \end{array}$
α-Декарбоксилаза	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ \text{RCH} \text{---} \text{CO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{RCH}_2\text{NH}_3^+ + \text{HCO}_3^- \end{array}$
β-Декарбоксилаза	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{NH}_3^+ \\   \quad \quad \quad   \\ \text{O}_2\text{C} \text{---} \text{CH}_2\text{CH} \text{---} \text{CO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{CHCO}_2^- + \text{HCO}_3^- \end{array}$
β-ОН-десмолаза (альдолаза)	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{O} \\   \quad \quad \quad \parallel \\ \text{RCH} \text{---} \text{CH} \text{---} \text{CO}_2^- \rightleftharpoons \text{R} \text{---} \text{C} \text{---} \text{H} + \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2^- \\   \\ \text{OH} \end{array}$

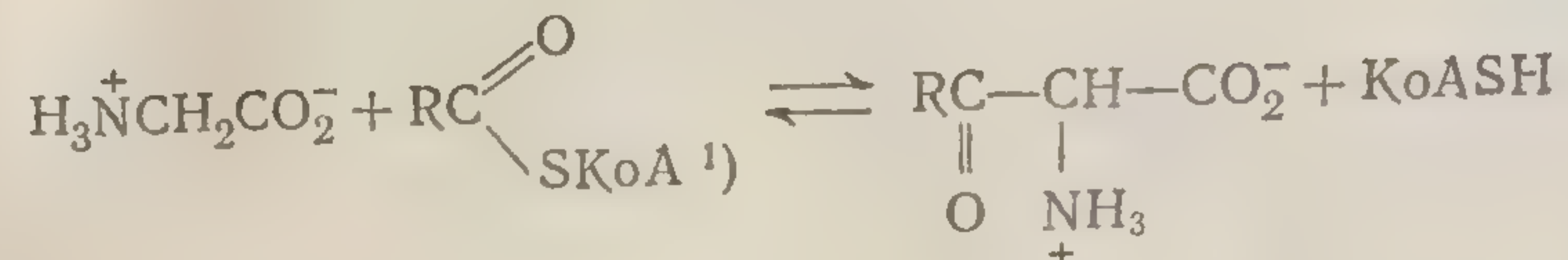




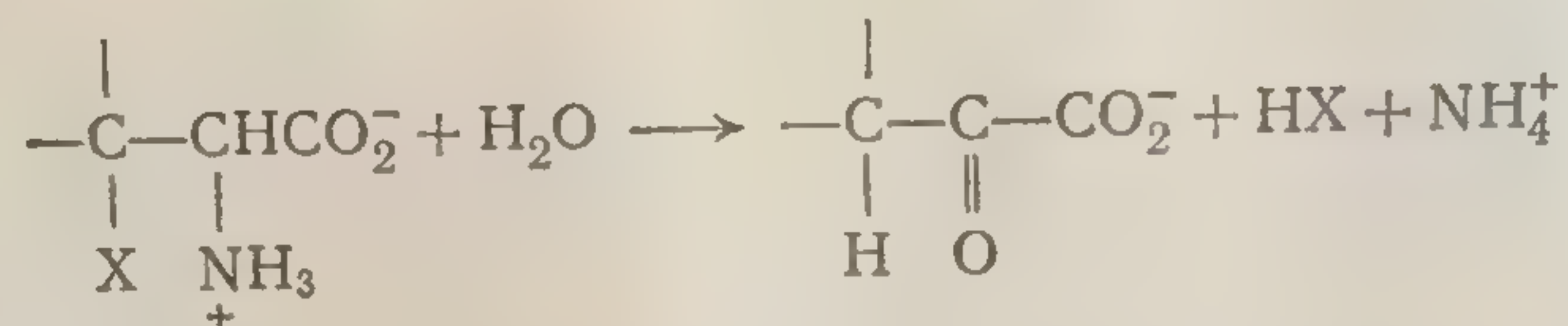
β-ОН-десмолаза (альдолаза)



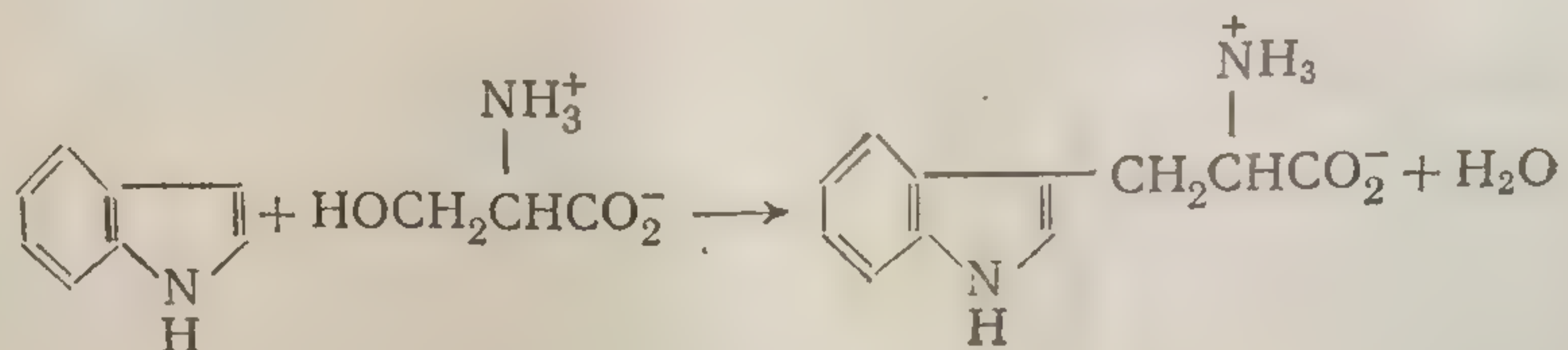
Ферменты конденсации глицина  
(и серина)



α,β-Элиминирование (X — полярный  
заместитель)



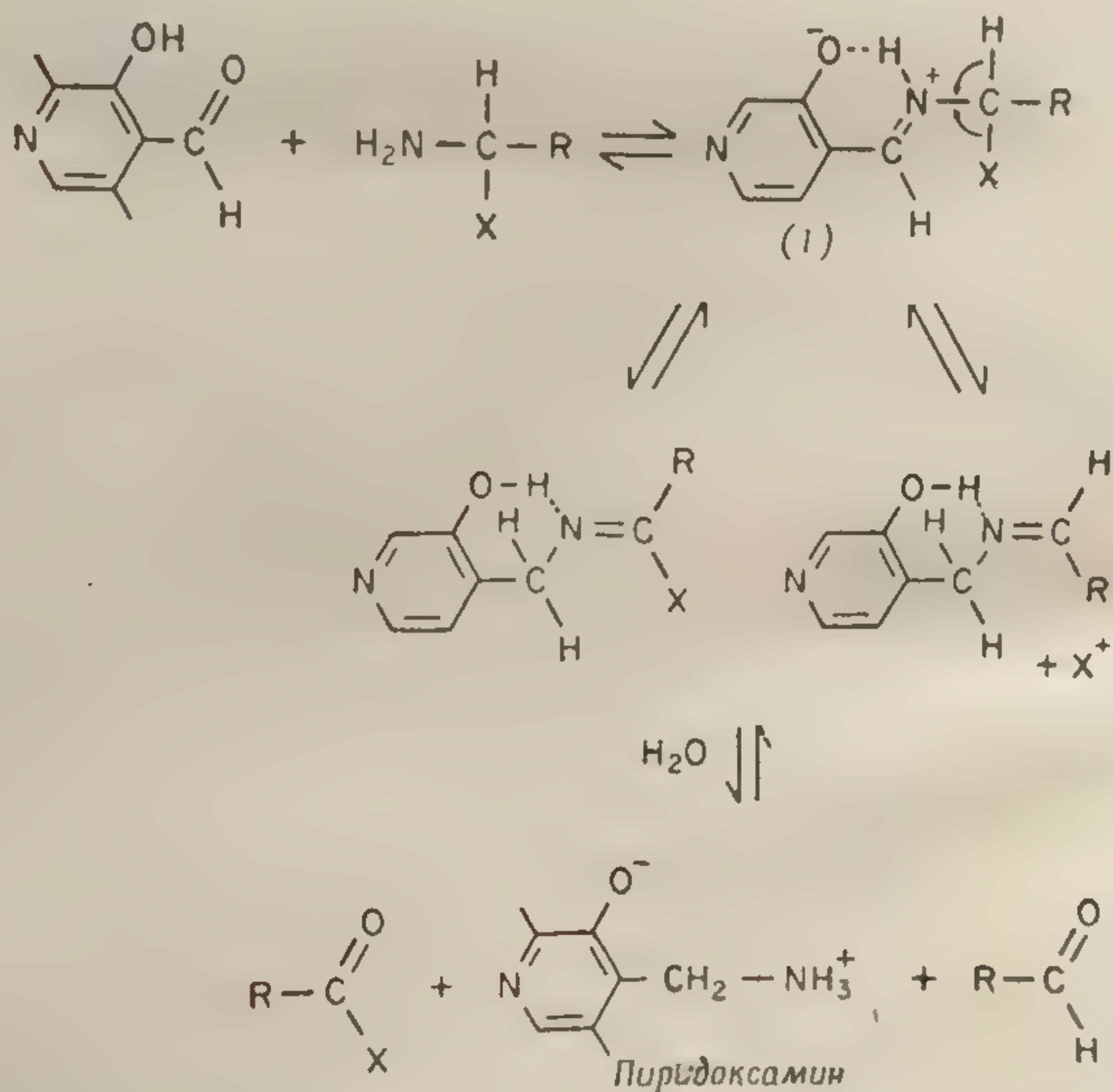
β-Конденсация (синтазы)



<sup>1)</sup> Ацилкофермент А (см. разд. 3).



ряд процессов переноса электронной пары и протона и служит прекрасным примером обсуждавшихся ранее механизмов, при которых внутримолекулярная химическая реакция проходит через ряд промежуточных стадий и все они представляют собой процессы с относительно низкой энергией активации. В случае ферментативного катализа оказалось необходимым несколько модифицировать формулировку последовательности катализируемых пиридоксалем реакций, так как было найдено, что в ферменте пиридоксальфосфат образует



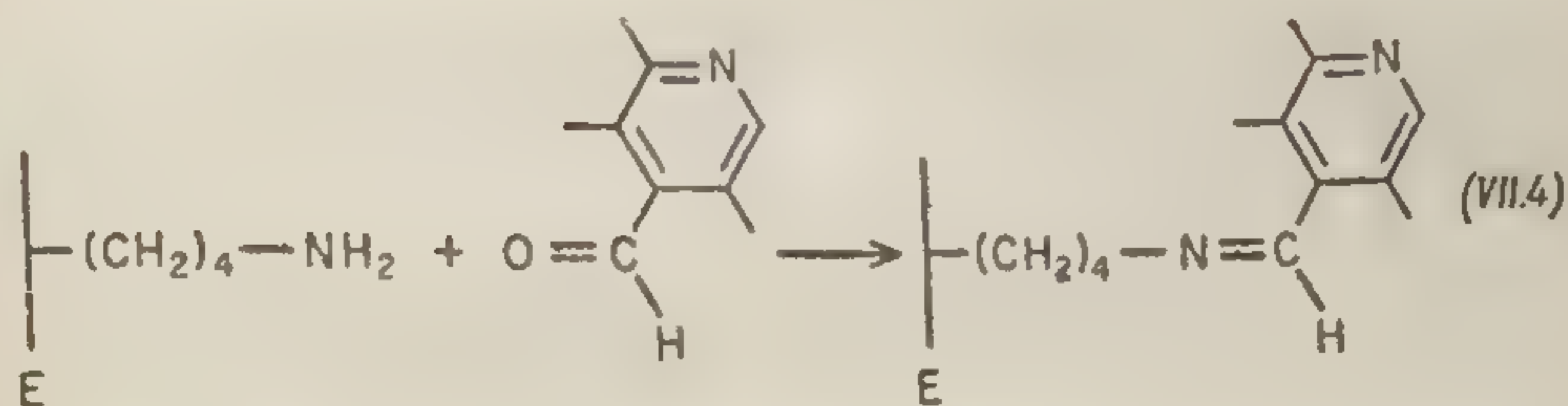
Ф и г. 85. Общий механизм реакций, катализируемых пиридоксалем.

химическую (альдиминную) связь с ε-аминогруппой одного из остатков лизина [уравнение (VII,4)].

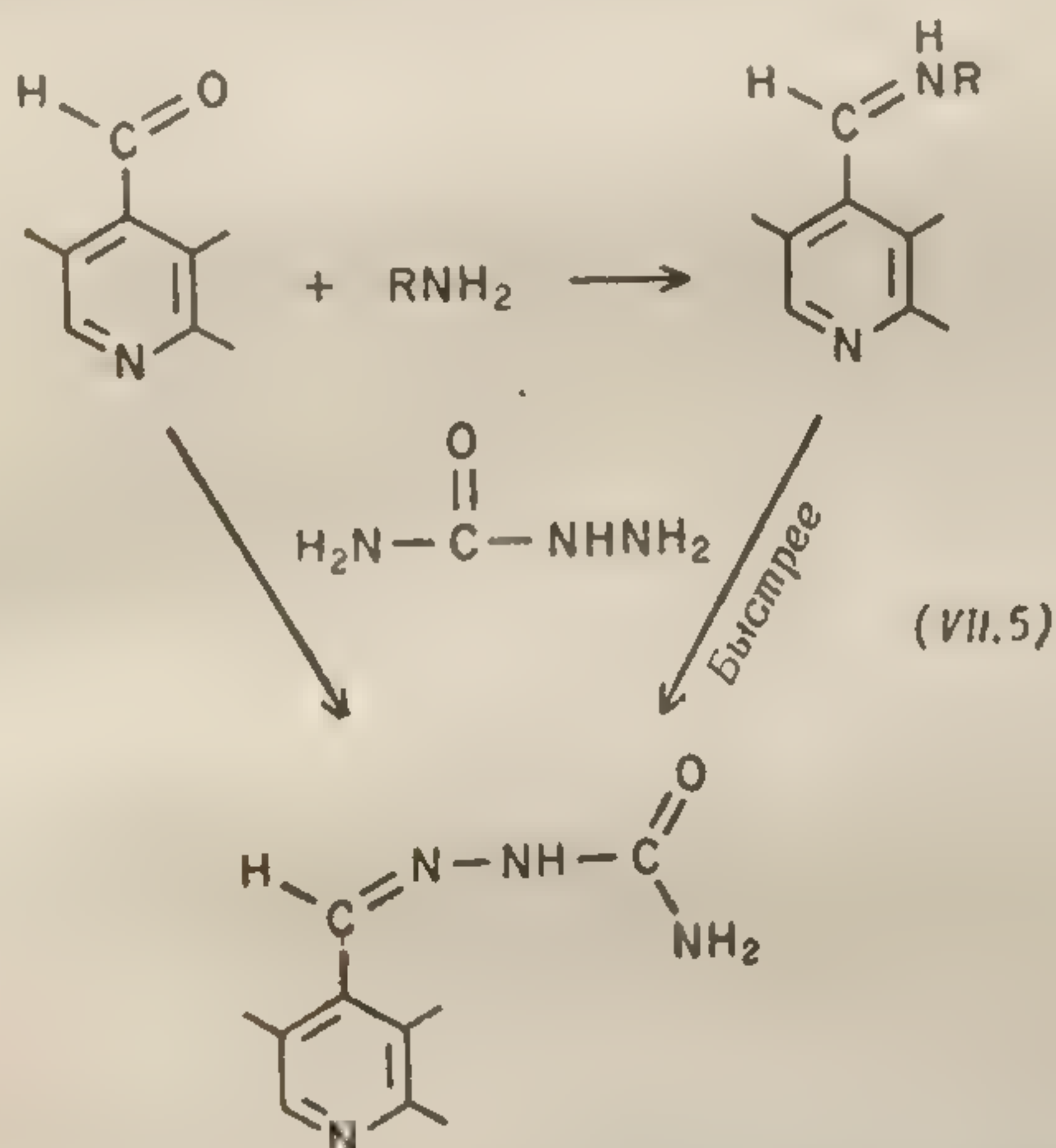
Интересно в  
в аналогичных  
пиридоксаль в  
базидом) быст  
ние (VII.5)].

Следовател  
мента, кофер  
Повышенную  
можно было  
сближения су  
реакция идет  
ших по типу  
потетические  
отнодь не за





Интересно в связи с этим отметить, что при катализе в аналогичных модельных системах иминопроизводные пиридоксаль взаимодействуют с субстратом (семикарбазидом) быстрее, чем сам пиридоксаль [уравнение (VII.5)].



Следовательно, связываясь с активным центром фермента, кофермент заранее активируется для реакции. Повышенную скорость таких ферментативных реакций можно было бы объяснить, помимо принудительного сближения субстрата и кофактора, также и тем, что реакция идет через ряд переносов протона, происходящих по типу общего кислотно-основного катализа. Гипотетические схемы, иллюстрирующие принципы, но отнюдь не законченные модели детального механизма,



изображены на фиг. 86. Методами релаксационной кинетики было установлено, что самыми медленными реакциями переноса протона являются реакции отрыва протона от атома углерода. Протекающие с участием кофермента процессы переноса электронной пары облегчают общий кислотно-основной катализ отрыва протона.

В промежуточном «шиффовом основании» (I на фиг. 85) «ослабляется» связь атома водорода или

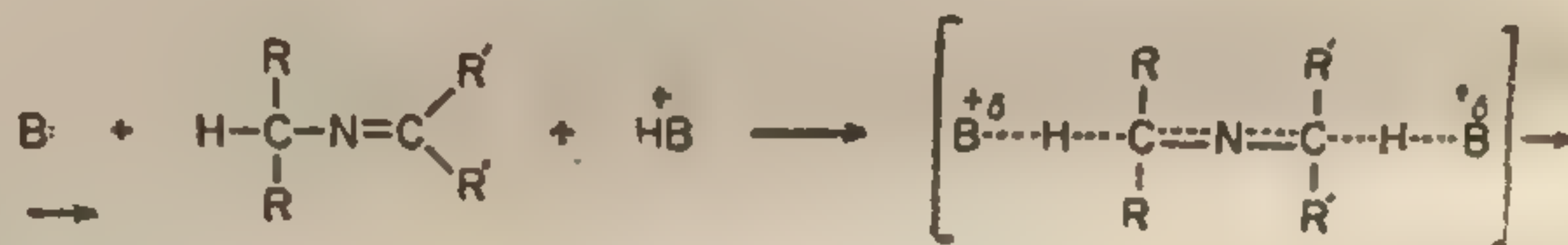


I

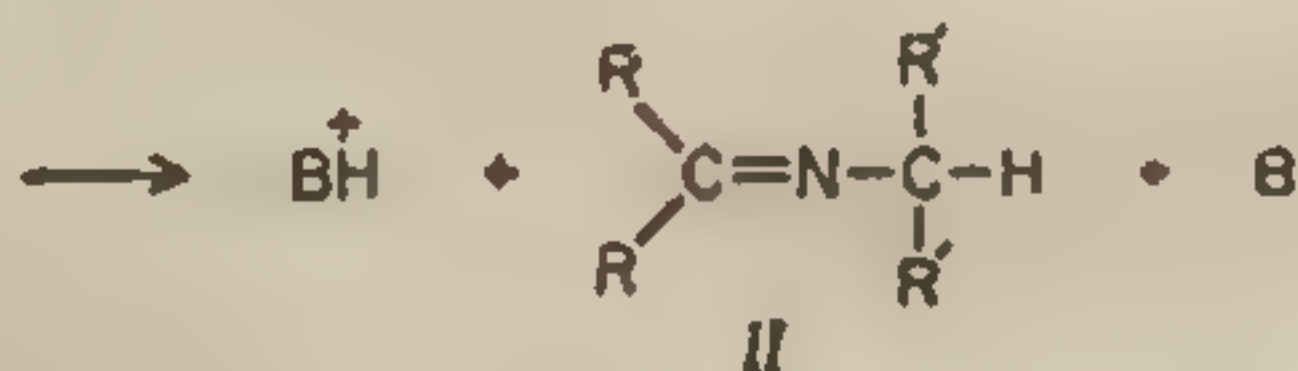
А



II



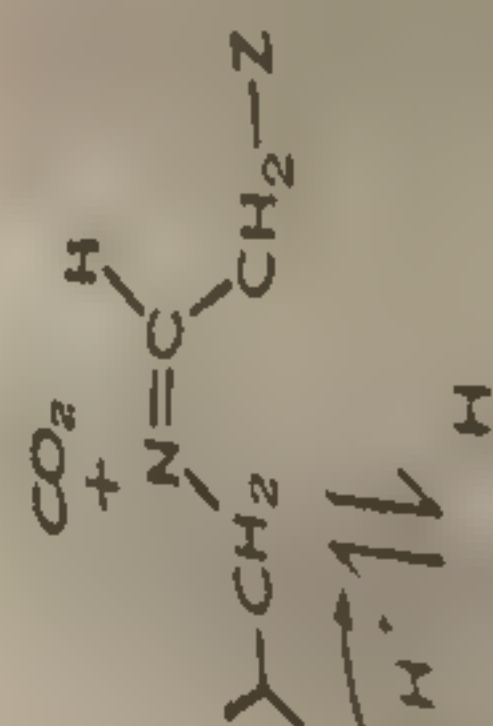
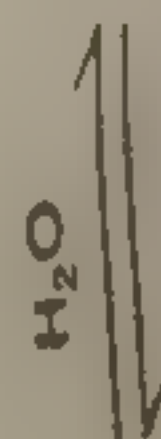
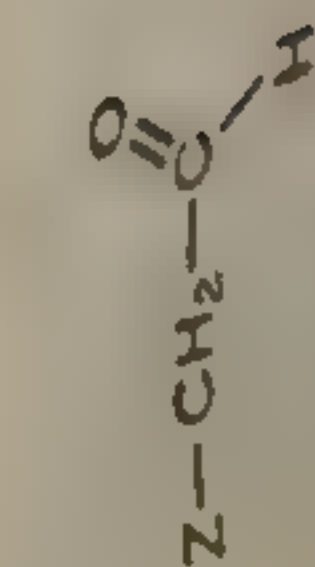
Б



II

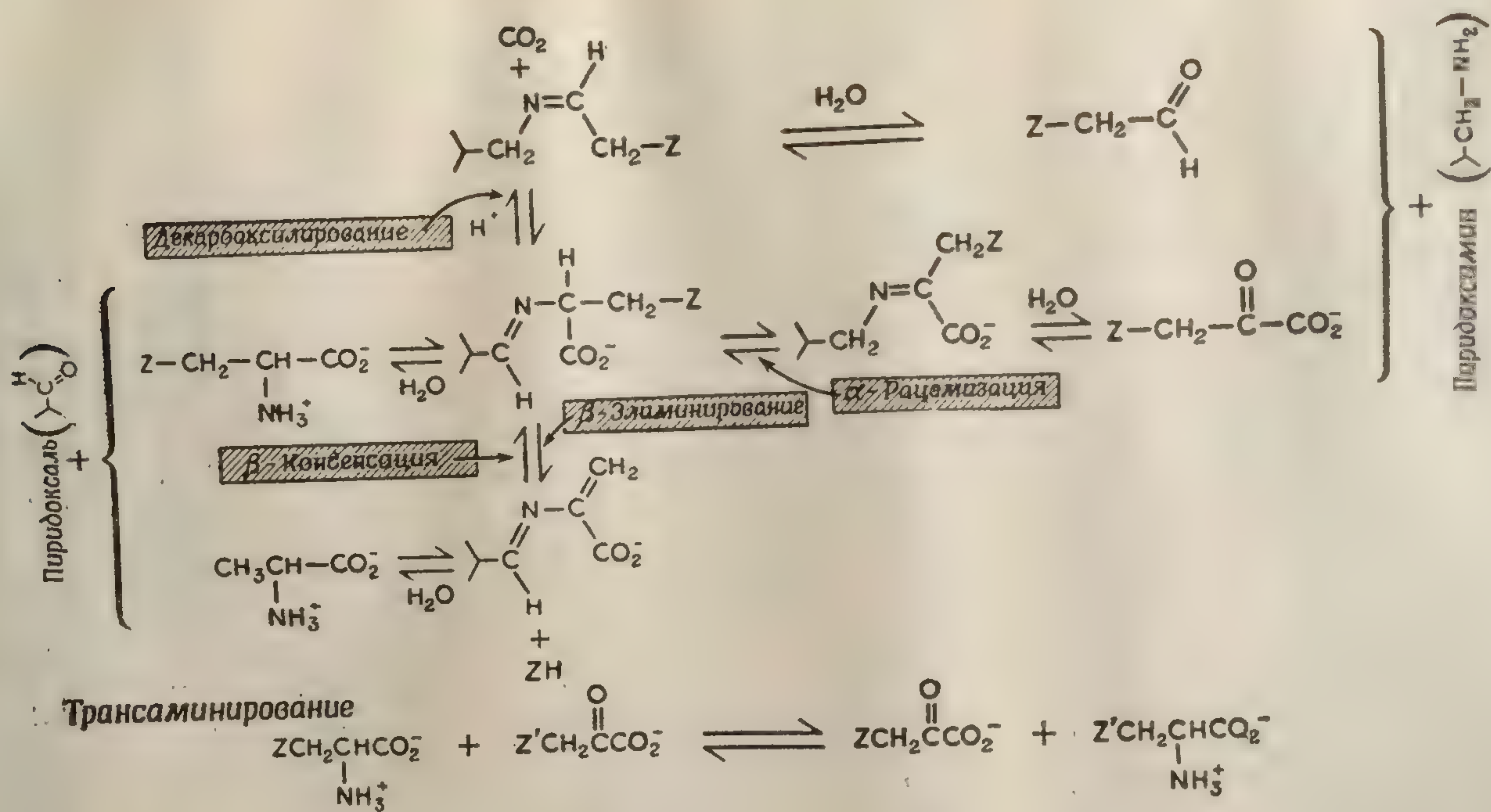
Фиг. 86. Таутомеризация протонированного промежуточного шиффового основания в результате общего кислотно-основного катализа при реакциях, протекающих с участием пиридоксаля (А и Б — два гипотетических механизма).

группы X с α-углеродным атомом субстрата, поскольку в нем обеспечен легкий путь переноса электронной пары к коферменту. Таким образом облегчается протекание целого ряда реакций (фиг. 87).



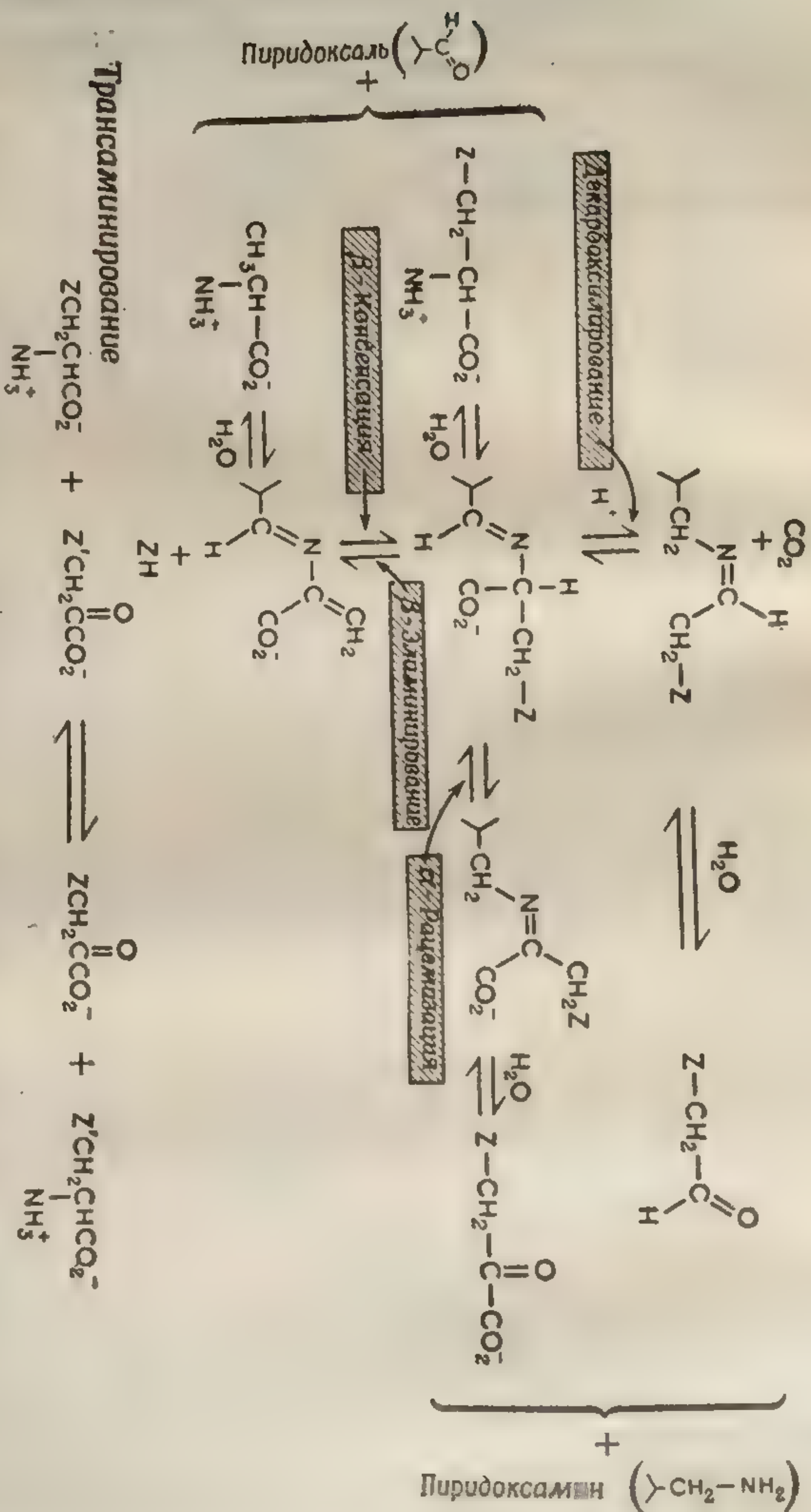
Декарбильное илрование





Фиг. 87. Общий механизм разнообразных реакций, катализируемых пиридоксалем.

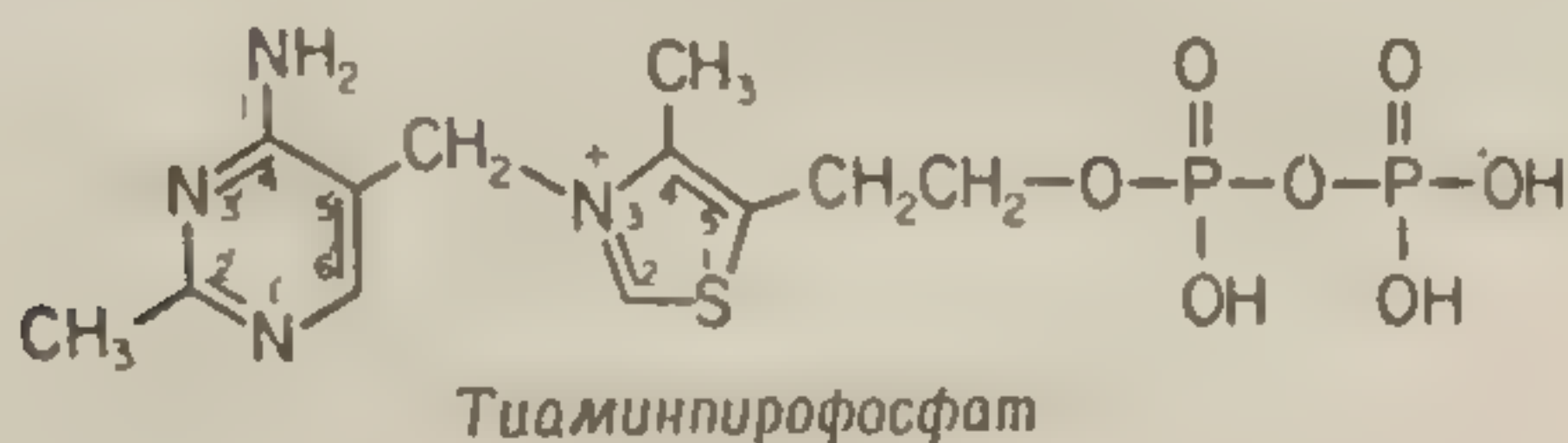




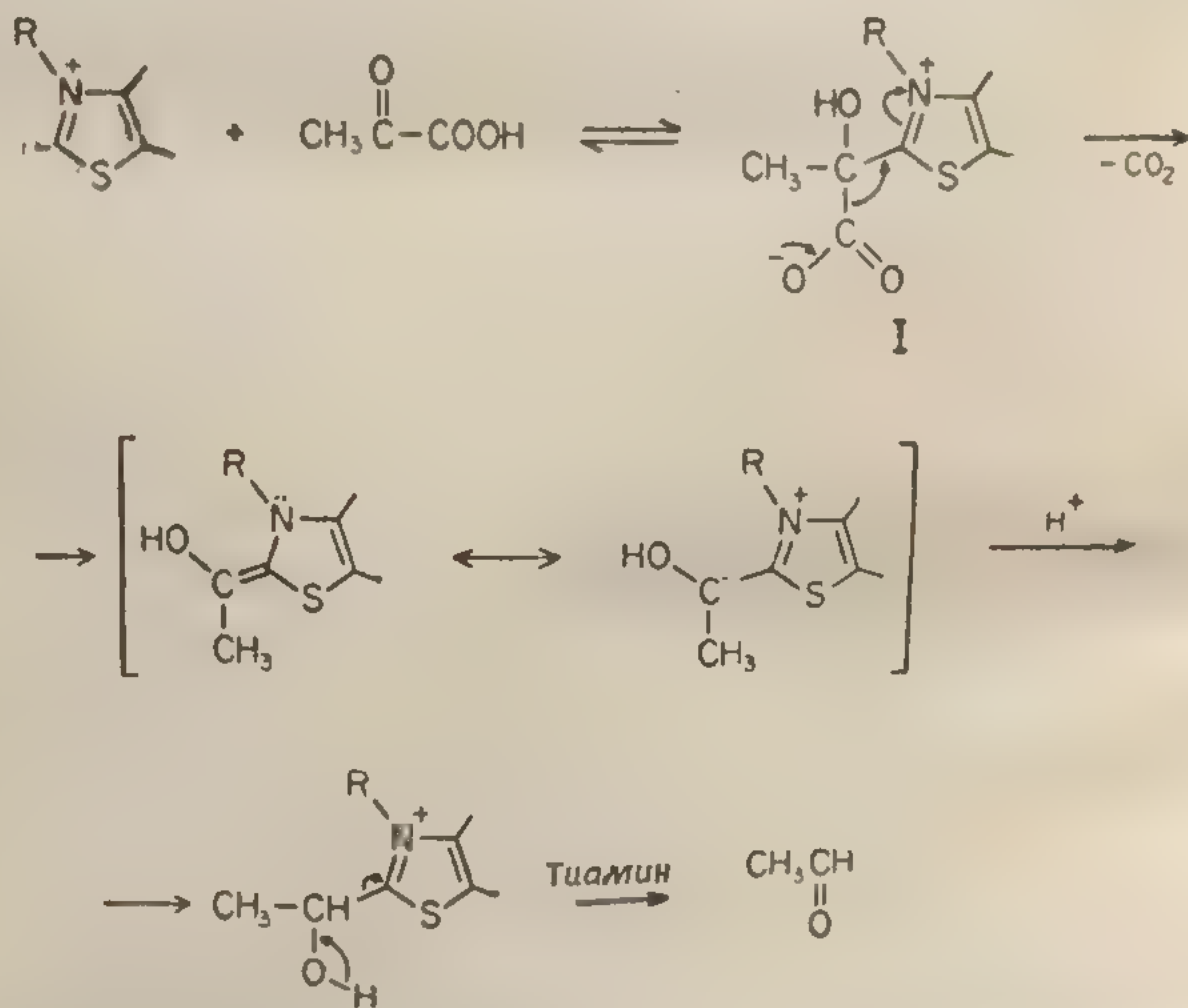
Фиг. 87. Общий механизм разнообразных реакций, катализируемых пиридоксалем.



## 2. РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ ТИАМИНПИРОФОСФАТА



Подобно пиридоксальфосфату, тиаминпирофосфат и свободное основание тиамин могут катализировать не-

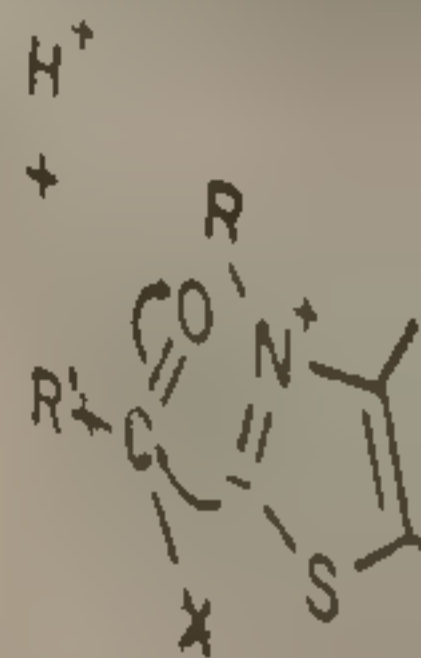


Ф и г. 88. Механизм катализируемого тиамином декарбоксилирования пировиноградной кислоты.

которые реакции, осуществляемые комплексами тиамин—фермент. Каталитически активной частью молекулы является серусодержащее пятичленное тиазольное кольцо. Атом водорода в положении 2 этого кольца

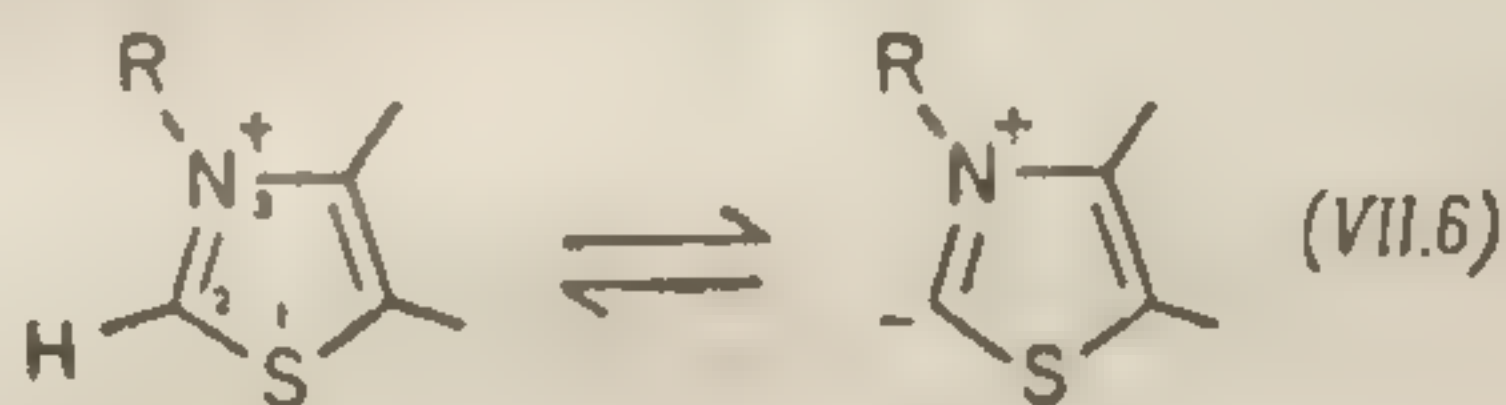
быстро обмени-  
щее время тве-  
тивным центро-  
стве по сесс-  
N-3 увеличивае-  
ры (уравнение

Предположите-  
тализа тиамин-  
ной кислоты по-  
служивает здесь  
цесса переноса  
Этот нефе-  
Бреслоу, може-  
тивные реакции  
акции включа-  
щепление связ-  
-CO<sub>2</sub>) и эле-  
атому в аддук-



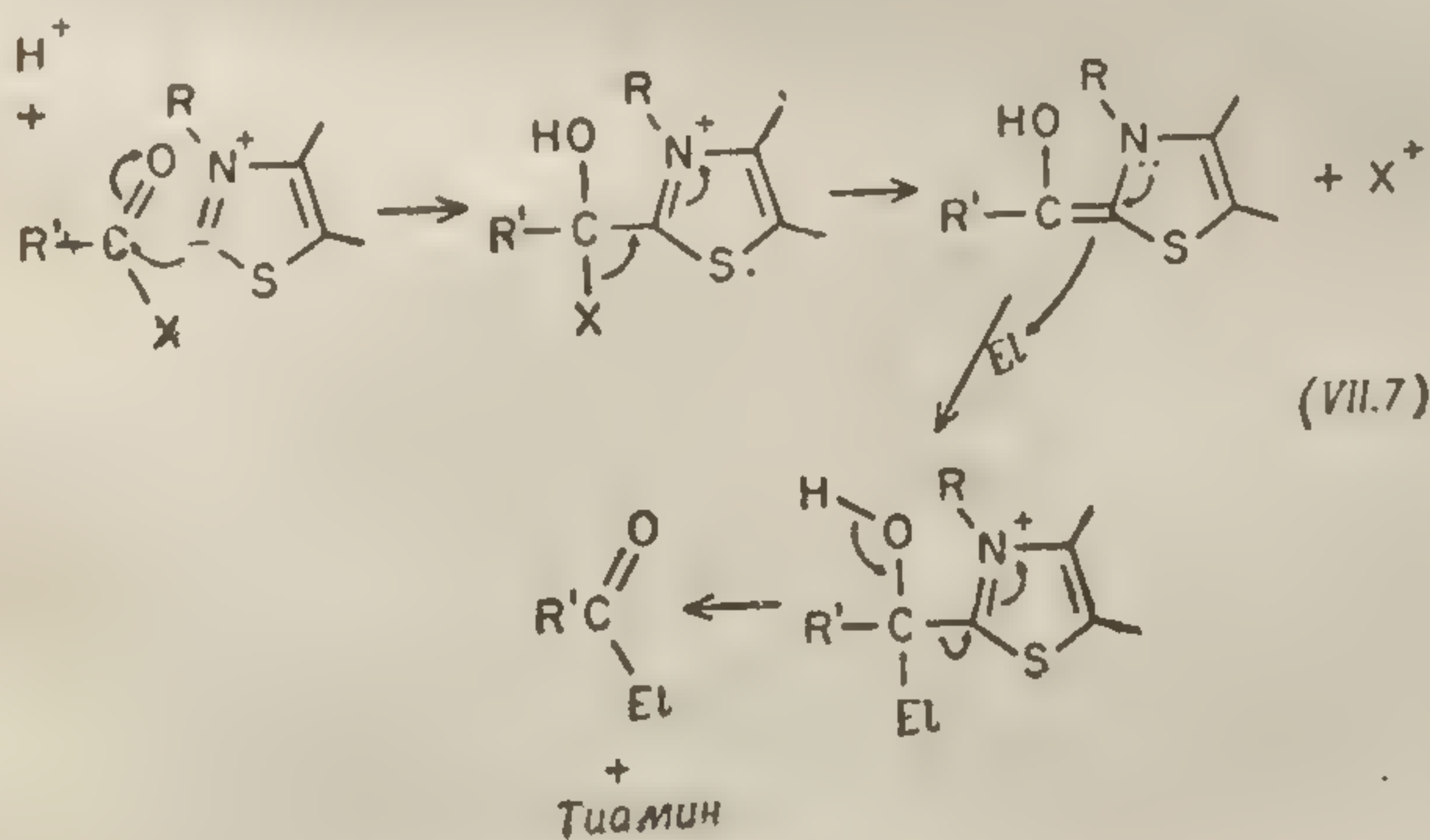


быстро обменивается в водном растворителе; в настоящее время твердо установлено, что каталитически активным центром молекулы является атом С-2. Присутствие по соседству положительного заряда на атоме N-3 увеличивает стабильность этой «илидной» структуры [уравнение (VII.6)].



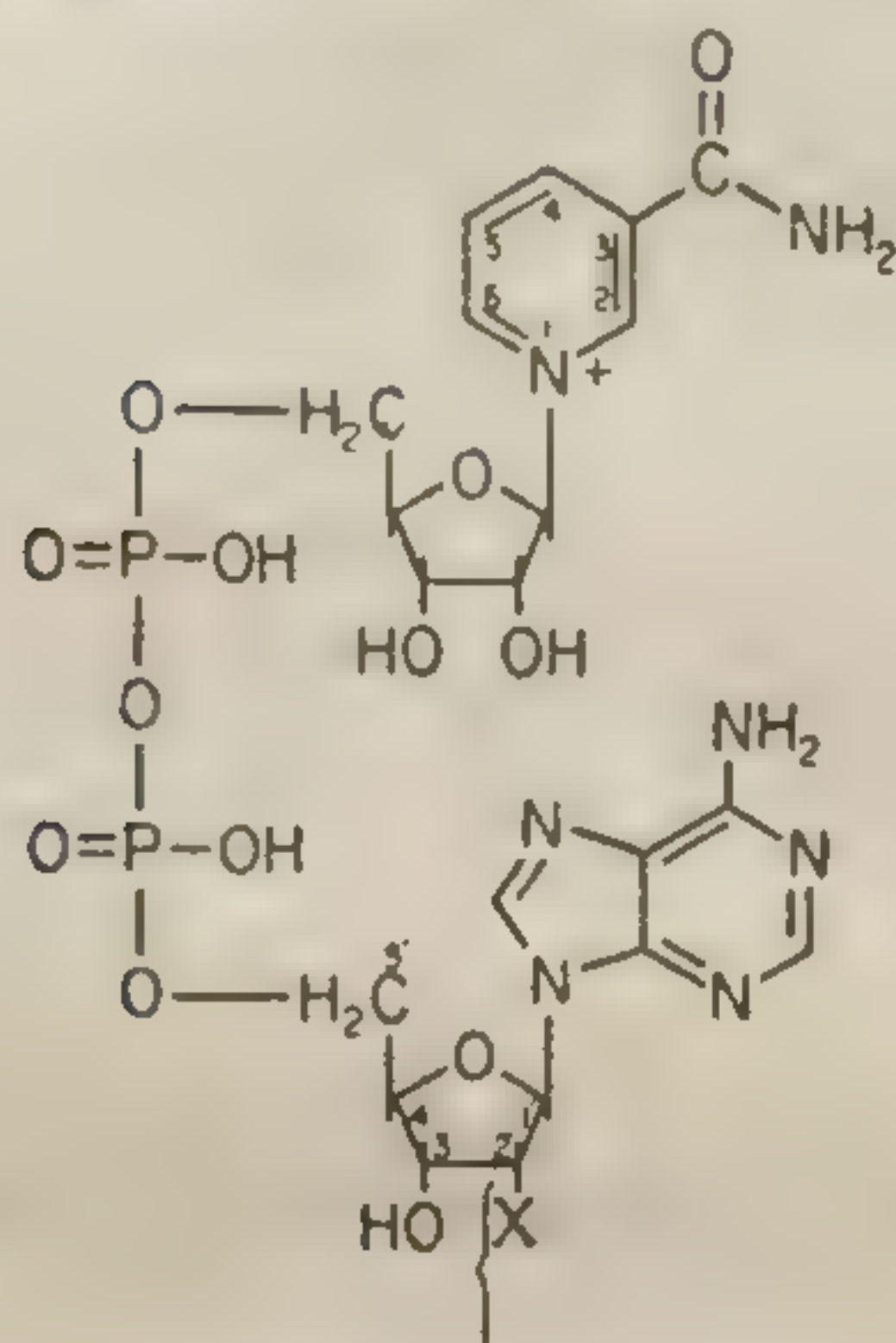
Предположительный механизм неферментативного катализа тиаминном декарбоксилирования пировиноградной кислоты показан на фиг. 88. Особого внимания заслуживает здесь роль кофермента в осуществлении процесса переноса электронной пары.

Этот неферментативный механизм, предложенный Бреслоу, может быть распространен на все ферментативные реакции, катализируемые тиаминном. Все эти реакции включают нуклеофильную атаку тиаминном, расщепление связи  $\text{CO}-\text{X}$  (где X обычно означает  $-\text{H}$  или  $-\text{CO}_2^-$ ) и электрофильную атаку по  $\alpha$ -углеродному атому в аддукте субстрат—тиамин:



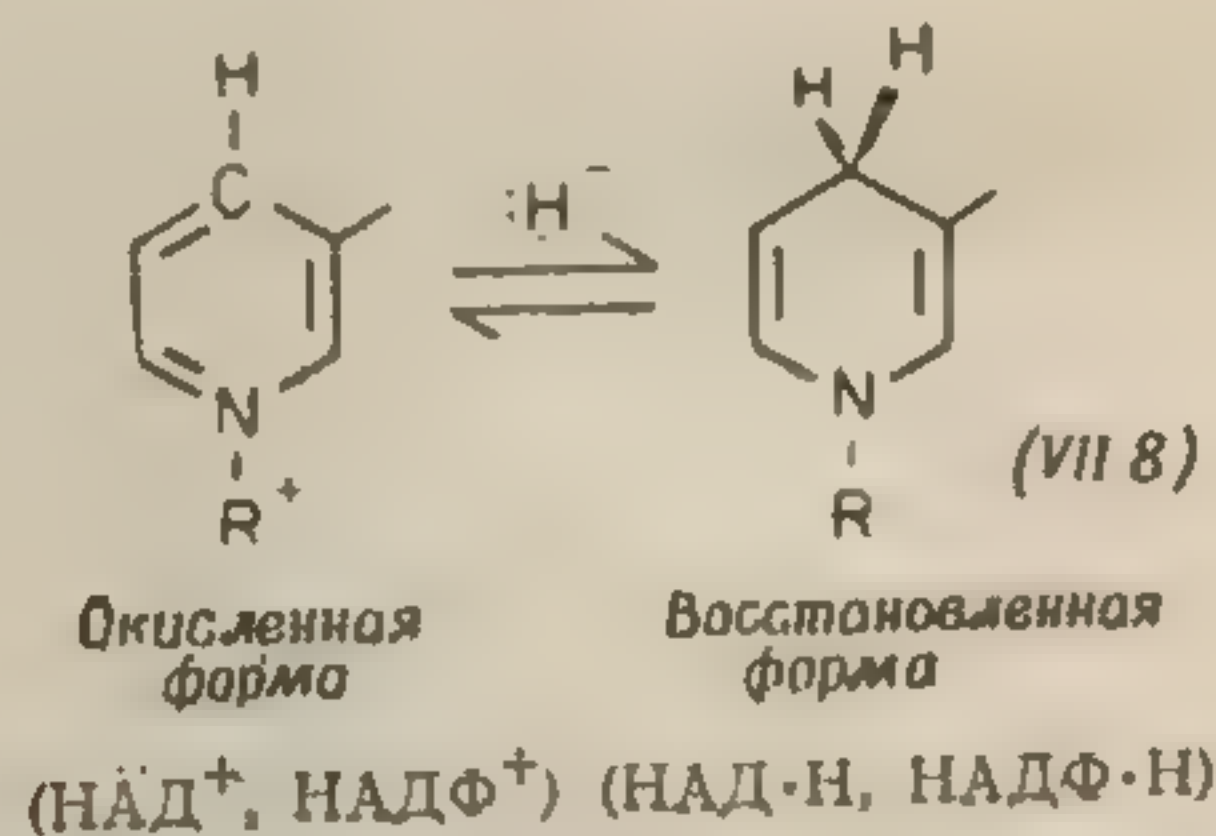


## 3. ПИРИДИНОВЫЕ НУКЛЕОТИДЫ



Окисленная форма  
пиридиннуклеотида  
(НАД, если  $X = OH$   
НАДФ, если  $X = OPO_3H_2$ )

Пиридиновые нуклеотиды в окисленном или восстановленном состоянии участвуют в самых разнообразных ферментативных реакциях присоединения и отщепления водорода. При этом водород присоединяется или отщепляется в положении С-4 пиридинового ядра. Восстановление (гидрогенизация) пиридиновых нуклеотидов приводит к образованию тетрагонального атома С-4 [уравнение (VII.8)]:



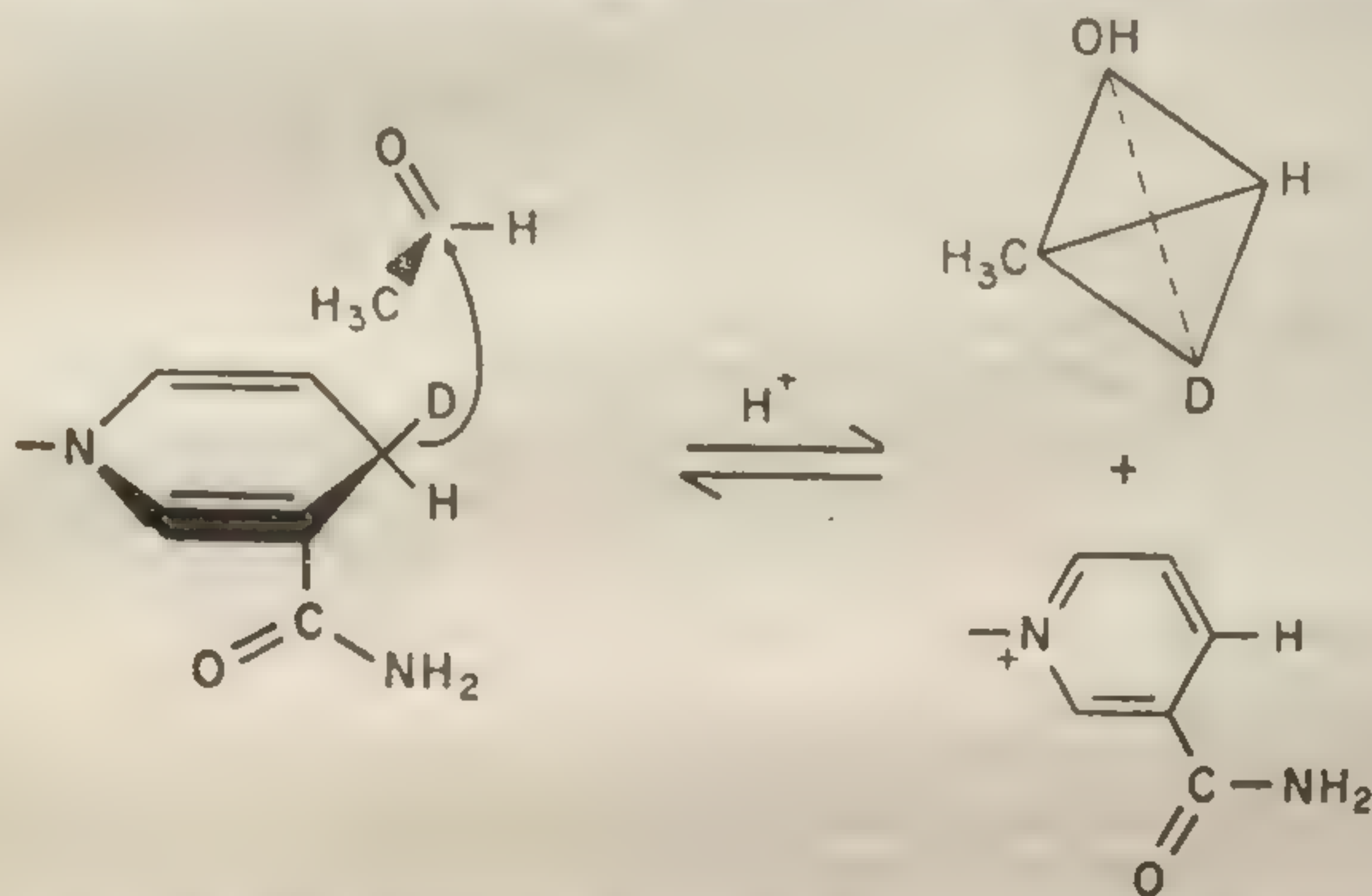
Было показано, что во всех изученных ферментативных процессах перенос водорода в положение С-4 происходит стереоспецифически, так же как и отщепление

Фиг. 89. Стереоспецифичность

фичности не от субстрата ни происхо. При этом во. рода на моле. условия жест. тализатора-ф. же протекат. ифичность. ма свидетел. ваемых на г. комплексе. вновь обрати. возможность уч. ферментатив. полагаемого. мало, так ка. родственные. ни с одним. ментативных. зование про.



водорода от субстрата. В качестве иллюстрации на фиг. 89 изображена схема обратимого восстановления ацетальдегида посредством НАД. Из этой стереоспеци-



Фиг. 89. Стереоспецифичность реакции обратимого восстановления альдегида посредством восстановленного НАД.

фичности не обязательно следует, что перенос водорода от субстрата к коферменту или в обратном направлении происходит путем прямого переноса гидрид-иона. При этом возможен и промежуточный перенос водорода на молекулу фермента или растворителя; но при условии жесткого взаиморасположения кофермента, катализатора-фермента и субстрата реакция может все же протекать стереоспецифически. Подобная стереоспецифичность независимо от порождающего ее механизма свидетельствует о жестких ограничениях, накладываемых на геометрию реакционноспособных центров в комплексе фермент—кофермент—субстрат. Следует вновь обратить внимание (см., например, фиг. 89) на возможность участия общего кислотно-основного катализа в ферментативной реакции. О детальном механизме предполагаемого переноса гидрид-иона известно довольно мало, так как в отсутствие фермента ни кофермент, ни родственные ему модельные соединения не реагируют ни с одним из обстоятельно изученных субстратов ферментативных реакций даже в том случае, когда образование продукта термодинамически выгодно (как, на-



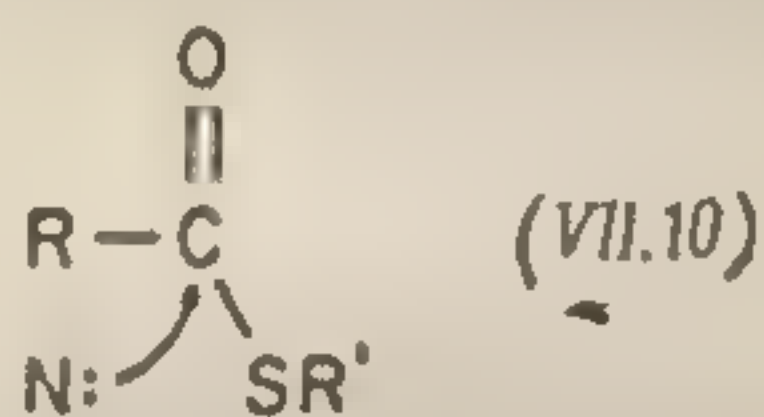




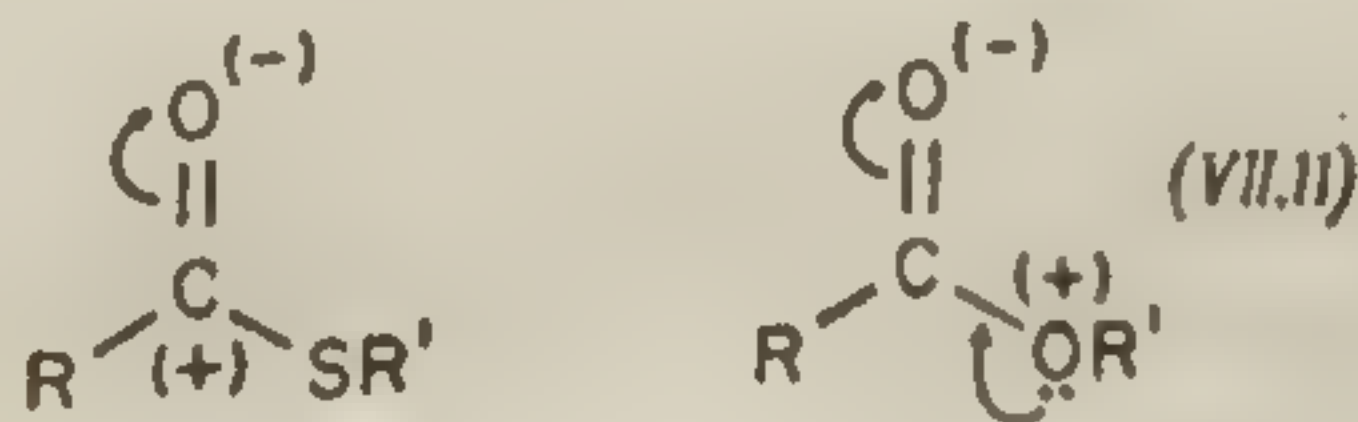
тических центров может сделать возможным дальнейшее использование тиоэфирного промежуточного соединения в процессах биосинтеза. Этот специальный каталитический путь является одним из главных путей синтеза углерод-углеродных связей в биологических системах. При наличии подходящего тиоэфира дальнейшая реакция может происходить по одному из двух ферментативных механизмов, обсуждавшихся ранее, а именно либо путем взаимодействия тиоэфира со вторым субстратом в активном центре первоначального фермента (кофермента), либо путем переноса коферментного тиоэфира к центру другого фермента, где он затем реагирует со вторым субстратом. Показано, что в действительности существуют механизмы обоого рода. Последний механизм (с «переносом») используется, по-видимому, значительно шире, особенно в тех случаях, когда реакция идет с участием наиболее распространенного тиолового акцептора ацильных остатков — кофермента А.

В химическом отношении тиоэфиры отличаются рядом свойств от соответствующих (кислородных) сложных эфиров спиртов.

1. Образование химической связи за счет  $3s$ - и  $3p$ -орбиталей серы приводит к возникновению более длинной и более слабой связи, чем в соответствующих кислородных соединениях. Поэтому наблюдается меньшее межэлектронное отталкивание и облегчается расщепление сложноэфирной связи при реакциях нуклеофильного замещения у карбонильного атома углерода

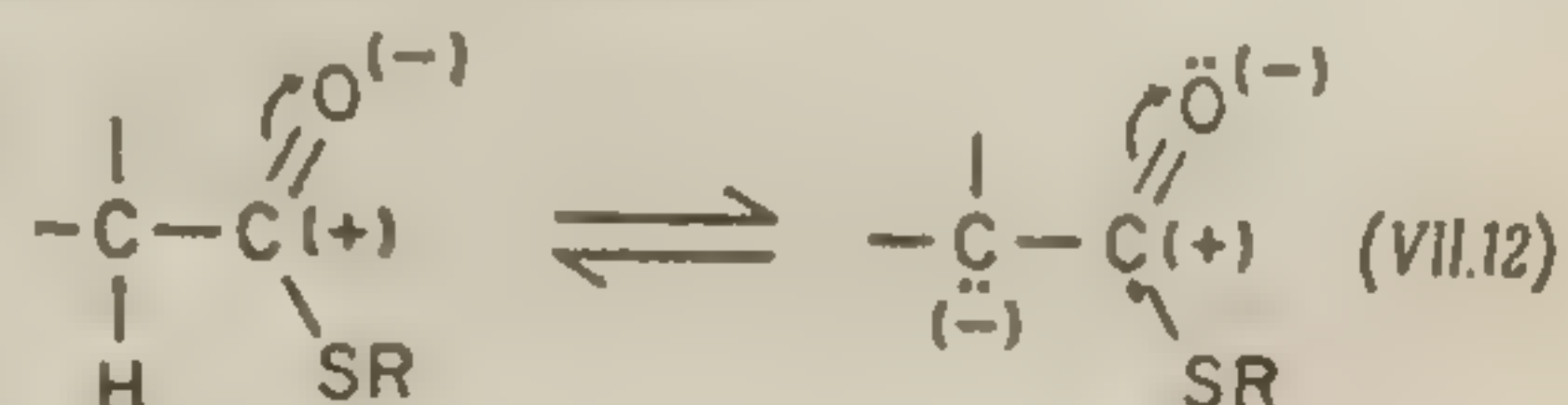


2. Значительно меньшая по сравнению с кислородом склонность серы к образованию « $\pi$ -связи» приводит к значительно большей локализации заряда в карбонильной группе

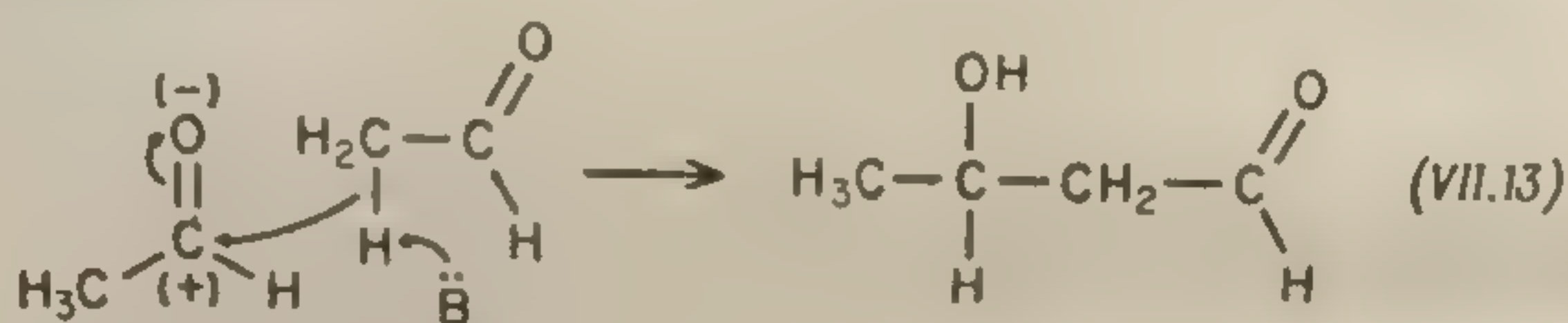




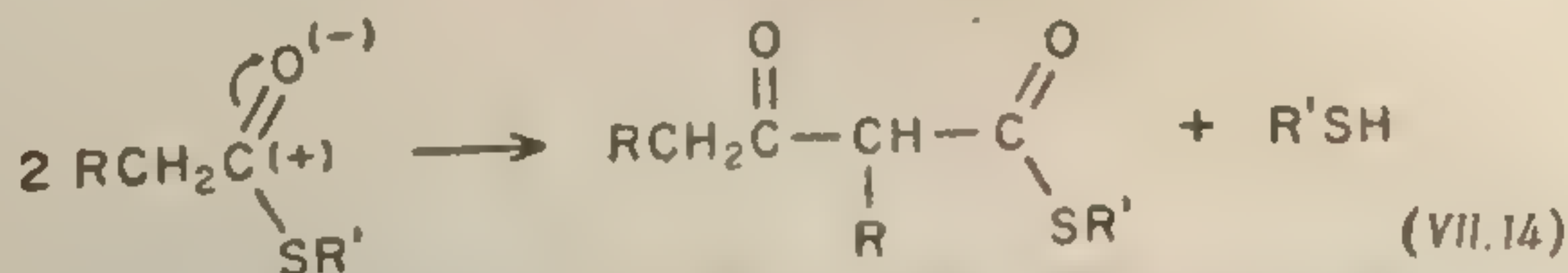
Вследствие этого карбонильный атом углерода в тиоэфире обладает значительно большей электрофильностью, чем в соответствующем кислородном соединении, и поэтому способен индуцировать отрицательный заряд на соседнем  $\alpha$ -углеродном атоме, например путем образования карбаниона



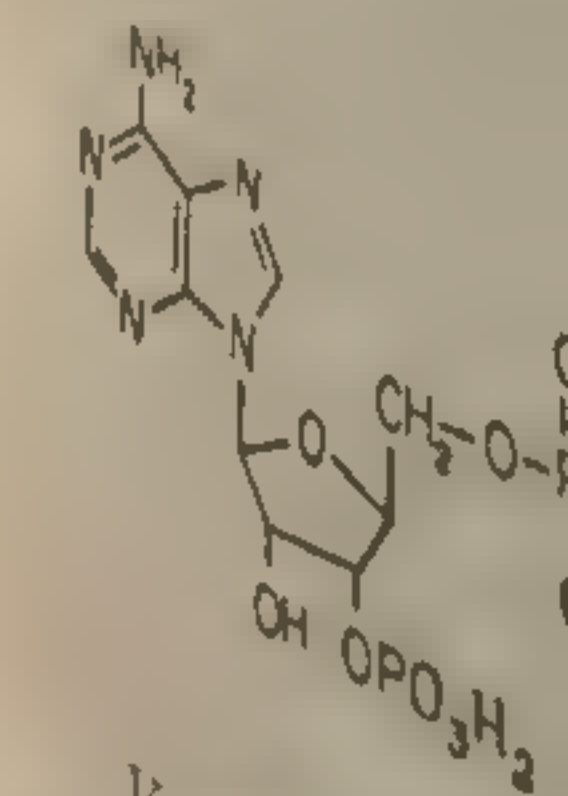
Своей реакционной способностью по  $\alpha$ -углеродному атому тиоэфиры напоминают карбонильные соединения (кетоны и альдегиды). Тиоэфиры легко вступают в реакции конденсации по  $\alpha$ -углеродному атому с электрофильными реагентами. Широко известным примером из органической химии может служить катализируемая основаниями альдольная конденсация двух молекул ацетальдегида



Аналогичным образом тиоэфиры легко вступают в реакции конденсации; конденсация может происходить как между тиоэфиром и карбонильными соединениями, так и между двумя молекулами тиоэфира (конденсация Клайзена):



Таким образом, тиоэфиры способны вступать в реакции двух различных типов: реакции нуклеофильного замещения и реакции по  $\alpha$ -углеродному атому с электрофильными агентами. В особых случаях индуцированная нуклеофильность при  $\alpha$ -углеродном атоме может передаваться атомам, более удаленным от карбониль-



Кофермент А  
разнообразных С  
ствуют ацильные  
кофермента и



Поскольку тиоловые группы имеются в остатках цистеина, входящих в состав ферментного белка, и поскольку была показана возможность связывания субстратов с ферментами тиоэфирной связью (гл. VIII), может возникнуть вопрос, зачем нужны коферменты, если они помогают выполнять функцию, для которой фермент, состоящий из одного только белка, уже имеет все необходимое. Если, однако, роль кофермента состоит в переносе активного ацильного остатка от одного фермента (места синтеза тиоэфира) к другому (месту последующей реакции), правдоподобное объяснение напрашивается само собой. В такой ситуации кофермент может выполнять две полезные функции: он может накапливать запас активных ацильных промежуточных соединений в концентрациях, сравнимых с его собственной (а не в концентрациях, сравнимых с числом активных центров), и может переносить ацильные промежуточные соединения в новое каталитическое окружение (активный центр второго фермента), которое может значительно отличаться от первоначального. Тем самым кофермент может ограничить число разнородных каталитических функций, которые должен выполнять активный центр каждого отдельного фермента.

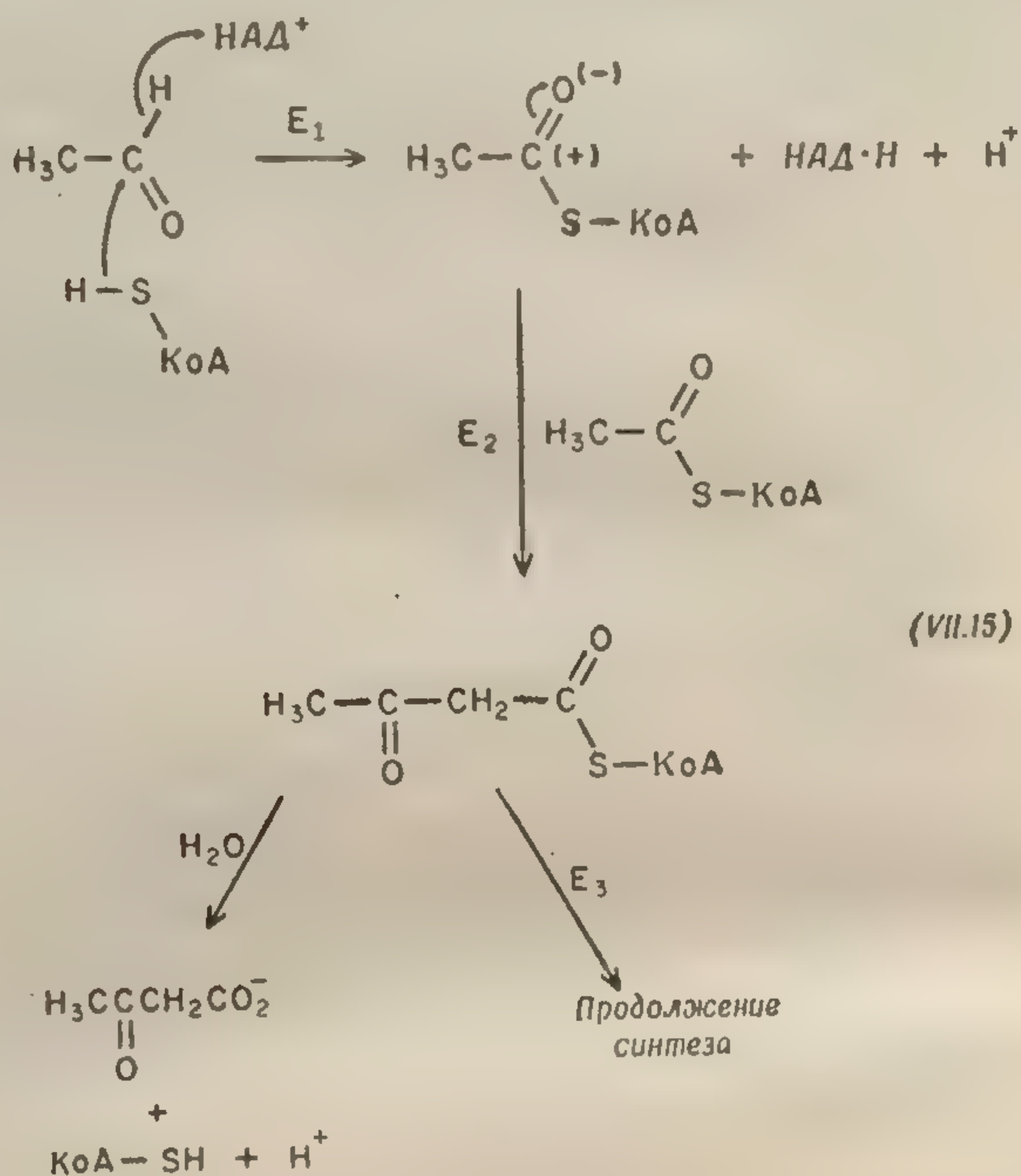
NC1=NC=NC2=C1N=CN2[C@H]3O[C@@H](COP(=O)(O)OP(=O)(O)OC[C@H](C)(C)C[C@@H](O)CNC(=O)CCNC(=O)CCS)[C@H](O)[C@H](COP(=O)(O)O)[C@H]3O

Кофермент А

Кофермент А (КоА) играет важную роль в самых разнообразных биохимических реакциях, в которых участвуют ацильные группы. Интересно, что ацилирование кофермента и дальнейшие реакции образовавшегося



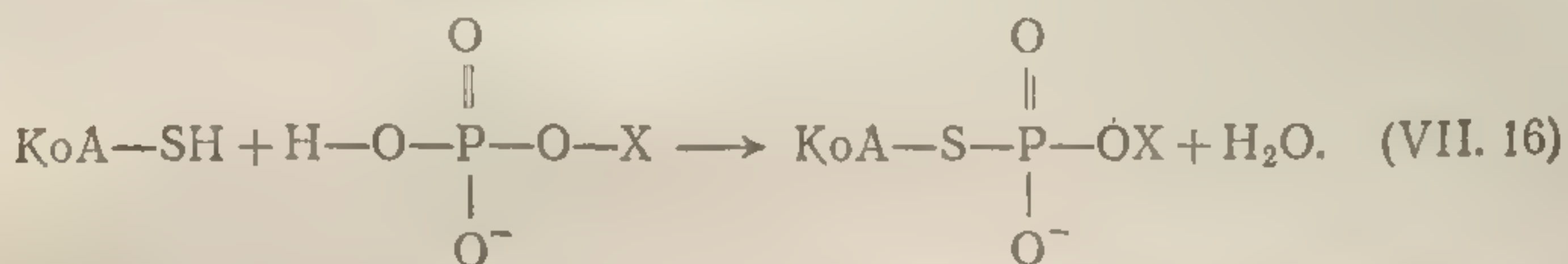
тиоэфира всегда протекают в различных активных центрах; в качестве примера приведем реакцию образования ацетоацетил-КоА из ацетальдегида



В ходе образования ацильного промежуточного соединения, ацетил-КоА, фермент-катализатор может увеличить скорость образования тиоэфира путем общего катализа по S—H-связи. Коль скоро образовался тиоэфир, реакции с участием ацильной группы могут происходить либо путем нуклеофильного замещения при карбонильном атоме углерода, либо путем электрофильной атаки по α-углеродному атому. Неполный список реакций S-ацилпроизводных КоА, протекающих по этим альтернативным путям, представлен в табл. 18.

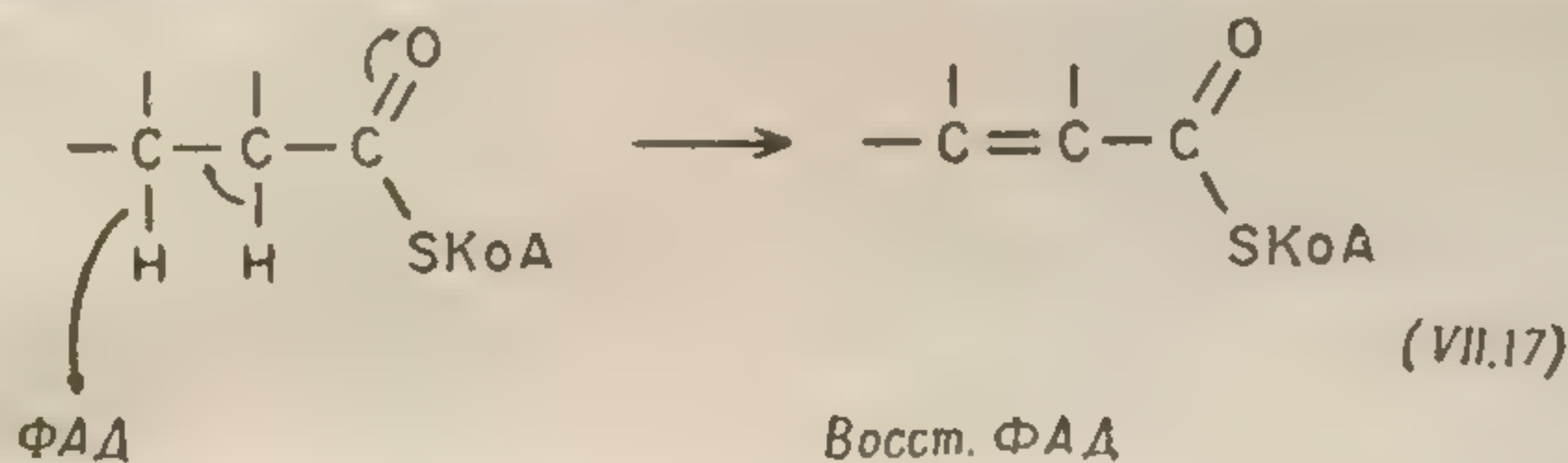


Следует отметить, что КоА может быть не только ацилирован, но и фосфорилирован:

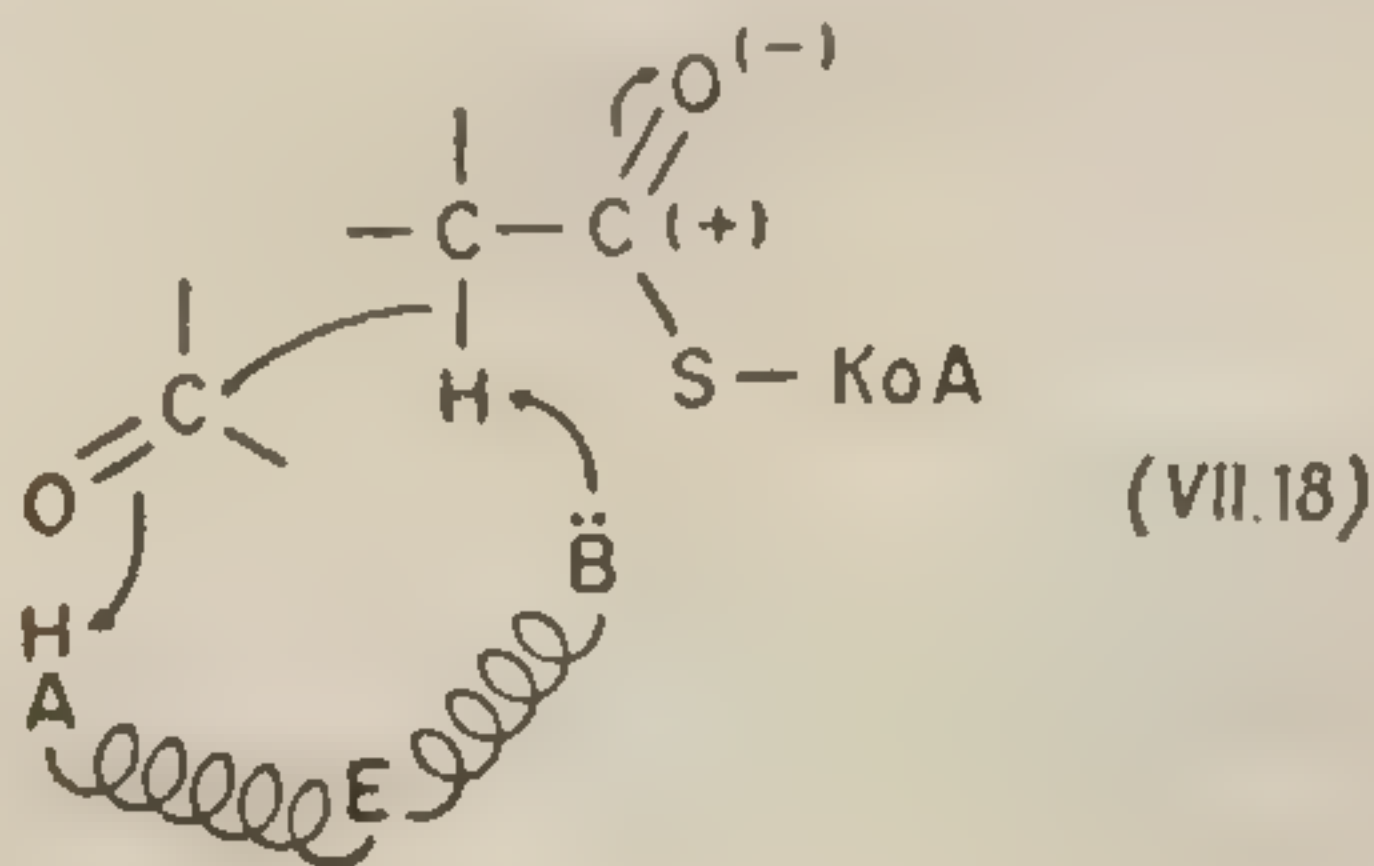


Такие фосфорилированные производные претерпевают реакции, аналогичные реакциям нуклеофильного замещения по карбонильному атому углерода в ацилпроизводных КоА, давая эфиры и ангидриды фосфорной кислоты.

Помимо участия в реакциях нуклеофильного замещения и реакциях конденсации, КоА принимает также участие в реакциях элиминирования, например в образовании ненасыщенных жирных кислот из насыщенных:



Механизм ферментативного катализа в реакциях нуклеофильного замещения с участием ацил- или фосфорилпроизводных КоА, возможно, сходен с механизмом, предложенным уже для других производных карбоновых кислот (разд. 3 гл. VI). Вполне вероятно, что реакции у  $\alpha$ -углеродного атома протекают путем отрыва от него протона с последующим общим кислотным катализом электрофильной атаки вторым субстратом:



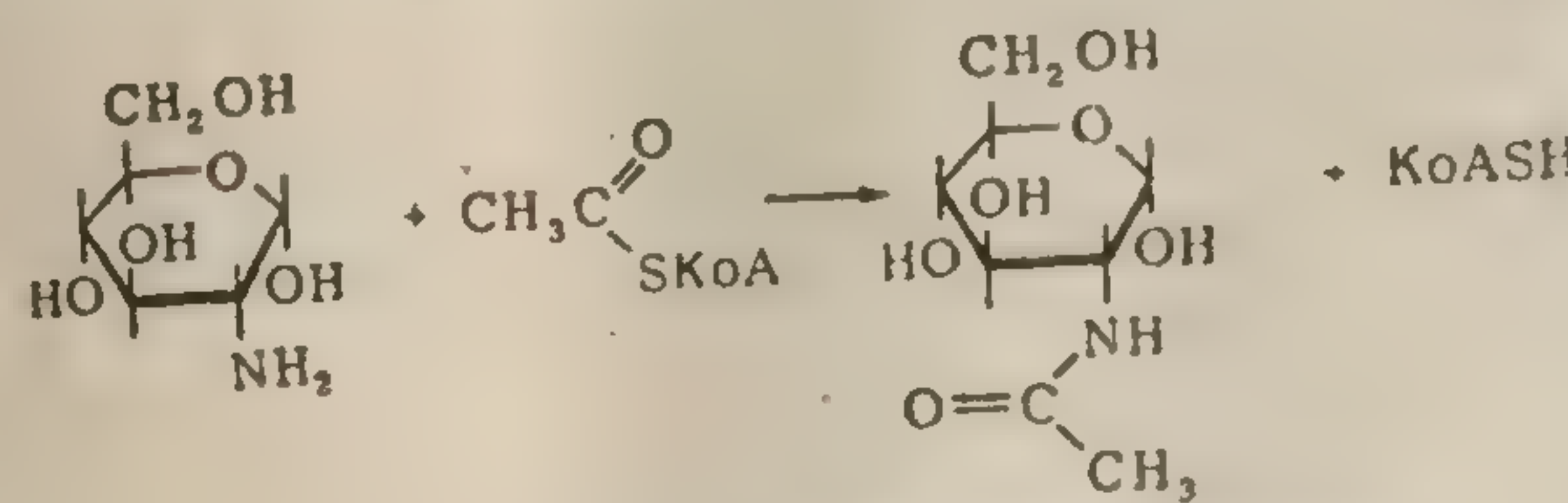
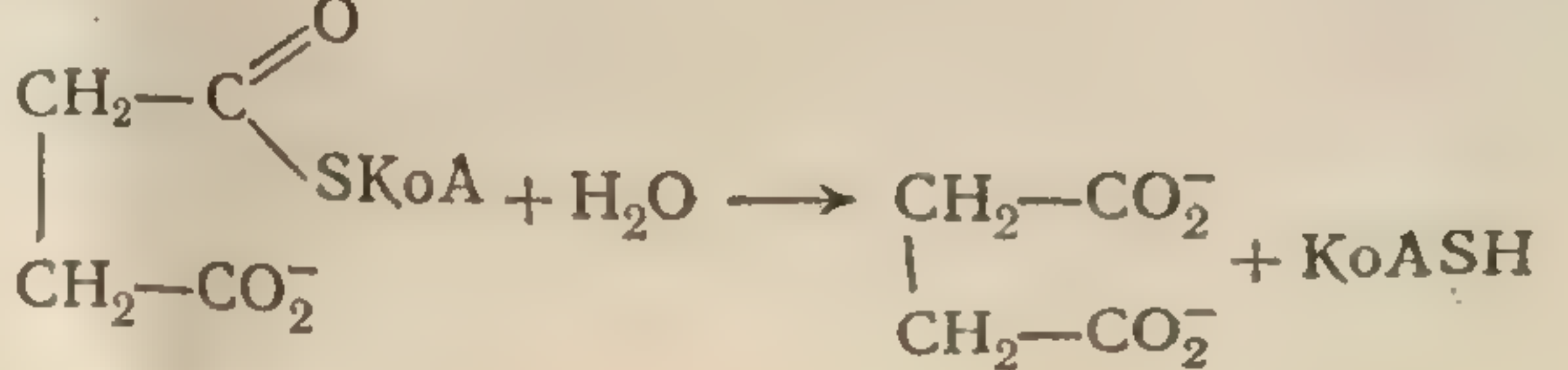
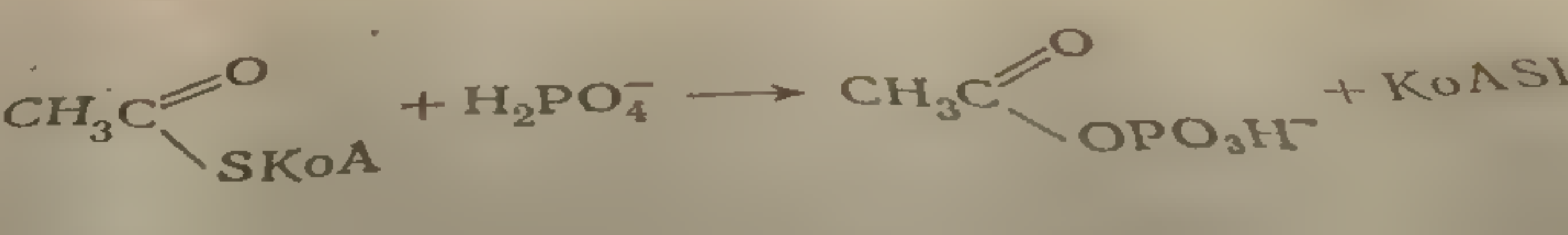


## Ферментативные реакции ацил- и фосфорилкофермента А

Общий механизм	Класс фермента	Типичная реакция
Нуклеофильная атака по С-атому карбонильной группы	Ацилаза	$  \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ \text{HO} \text{---} \text{C} \text{---} \text{OH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array} + \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ \text{HO} \text{---} \text{C} \text{---} \text{OH} \\   \\ \text{NH} \text{---} \text{C}(=\text{O})\text{CH}_3 \end{array} + \text{KoASH}  $ <p style="text-align: center;">N ацетилглюкозамин</p>
	(Деацилаза)	$  \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{---C}(=\text{O}) \\   \\ \text{CH}_2\text{---CO}_2^- \end{array} \text{SKoA} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{---CO}_2^- \\   \\ \text{CH}_2\text{---CO}_2^- \end{array} + \text{KoASH}  $ <p style="text-align: center;">(Сукцинил-КоА)</p>
	(Трансацилаза)	Сукцинил-КоА + Ацетоацетат $\longrightarrow$ Ацетоацетил-КоА + Сукцинат
	(Фосфотранс-ацетилаза)	$  \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O}) \\   \\ \text{SKoA} \end{array} + \text{H}_2\text{PO}_4^- \longrightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O}) \\   \\ \text{OPO}_3\text{H}^- \end{array} + \text{KoASH}  $
Нуклеофильная атака по фосфорильной группе	(Тиокиназа)	$  \text{Ацетил-КоА} + \text{АМФ} + \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\    \quad    \\ \text{---O---P---O---P---O---} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} \longrightarrow \text{АТФ} + \text{Ацетат} + \text{KoASH}  $
	Ацилредуктаза	Ацил-SKoA + НАД · Н + Н <sup>+</sup> $\longrightarrow$ Альдегид + НАД <sup>+</sup> + KoASH
	Фосфокиназа	$  \text{KoA---S---} \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{P---OH} \\   \\ \text{O}^- \end{array} + \text{АДФ} \rightleftharpoons \text{KoASH} + \text{АТФ}  $ <p style="text-align: center;">S-фосфо-КоА</p>
	Фосфорилтрансфераза	Сукцинат + S-фосфо-КоА $\longrightarrow$ Сукцинил-КоА + H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>



## Ферментативные реакции ацил- и фосфорилкофермента А

Общий механизм	Класс фермента	Типичная реакция
Нуклеофильная атака по С-атому карбонильной группы	Ацилаза	 <p style="text-align: center;">N ацетилглюкозамин</p> $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + \text{Ацетил-KoA} \longrightarrow (\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_3$ <p style="text-align: center;">(Ацетилхолин)</p>
	(Деацилаза)	 <p style="text-align: center;">(Сукцинил-KoA)</p>
	(Трансацилаза) (Фосфотранс-ацетилаза)	<p>Сукцинил-KoA + Ацетоацетат <math>\longrightarrow</math> Ацетоацетил-KoA + Сукцинат</p> 



	(Трансацилаза)	Сукцинил-КоА + Ацетоацетат $\longrightarrow$ Ацетоацетил-КоА + Сукцинат
	(Фосфотранс-ацетилаза)	$\text{CH}_3\text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{SKoA} \end{array} + \text{H}_2\text{PO}_4^- \longrightarrow \text{CH}_3\text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OPO}_3\text{H}^- \end{array} + \text{KoASH}$
	(Тиокиназа)	$\text{Ацетил-КоА} + \text{АМФ} + \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ ^-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{O}^- \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} \longrightarrow$ $\longrightarrow \text{АТФ} + \text{Ацетат} + \text{KoASH}$
	Ацилредуктаза	Ацил-SKoA + НАД · Н + Н <sup>+</sup> $\longrightarrow$ Альдегид + НАД <sup>+</sup> + KoASH
Нуклеофильная атака по фосфорильной группе	Фосфокиназа	$\text{KoA}-\text{S}-\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{P}-\text{OH} \\   \\ \text{O}^- \end{array} + \text{АДФ} \rightleftharpoons \text{KoASH} + \text{АТФ}$ <p style="text-align: center;">S-фосфо-КоА</p>
	Фосфорилтрансфераза	Сукцинат + S-фосфо-КоА $\longrightarrow$ Сукцинил-КоА + H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>



Общий механизм	Класс фермента	Типичная реакция
Конденсация по С-атому карбонильной группы	β-Кетоацилтио-лаза Трансацетилаза	$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{RC}(=\text{O})\text{SKoA} \rightarrow \text{RCCH}_2\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{KoASH}$ $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{HC}(=\text{O})\text{O}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{CO}_2^- + \text{KoASH}$
Электрофильные конденсации по α-углеродному атому	Синтаза	$\text{O}_2\text{C}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{CH}_2\text{CO}_2^- + \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons$ $\rightleftharpoons \text{O}_2\text{CCH}_2\overset{\text{OH}}{\underset{\text{CO}_2^-}{\text{C}}}-\text{CH}_2\text{CO}_2^- + \text{KoASH}$
	Карбоксилаза	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{CO}_2 + \text{АТФ} \xrightarrow{\text{Биотин}^1)} \text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{CO}_2^-}{\text{CH}}}-\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{SKoA} + \text{АДФ} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$
	Декарбоксилаза	$\text{CH}_2(\text{CO}_2^-)\text{SKoA} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ацетил-KoA} + \text{HCO}_3^-$
α, β-Элиминирование	Ацилдегидрогеназа	$\begin{array}{c}   \quad   \\ -\text{C}-\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} + \text{ФАД}^2) \rightarrow \begin{array}{c}   \quad   \\ -\text{C}=\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} \end{array} + \text{ФАД} \cdot \text{H}_2$
β-ОН-окисление	β-ОН-ацилдегидрогеназа	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ -\text{C}-\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{H} \end{array} + \text{НАД}^+ \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ -\text{C}-\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} \\   \quad   \end{array} + \text{НАД} \cdot \text{H} + \text{H}^+$

1) Кофактор в реакциях, связанных с активацией  $\text{CO}_2$ .

2) Флавинадениндинуклеотид, см. разд. 4.



Общий механизм	Класс фермента	Типичная реакция
Конденсация по С-атому карбоксильной группы	β-Кетоацилтио-лаза  Трансацетилаза	$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{RC}(=\text{O})\text{SKoA} \longrightarrow \text{RCCH}_2\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{KoASH}$ $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{HC}(=\text{O})\text{O}^- \longrightarrow \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{CO}_2^- + \text{KoASH}$
Электрофильные конденсации по α-углеродному атому	Синтаза	$\text{}^-\text{O}_2\text{C}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{CH}_2\text{CO}_2^- + \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons$ $\rightleftharpoons \text{}^-\text{O}_2\text{CCH}_2\overset{\overset{\text{OH}}{\mid}}{\underset{\underset{\text{CO}_2^-}{\mid}}{\text{C}}}-\text{CH}_2\text{CO}_2^- + \text{KoASH}$
	Карбоксилаза	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{CO}_2 + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Биотин}^{1)}} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{C}(=\text{O})\text{SKoA}$



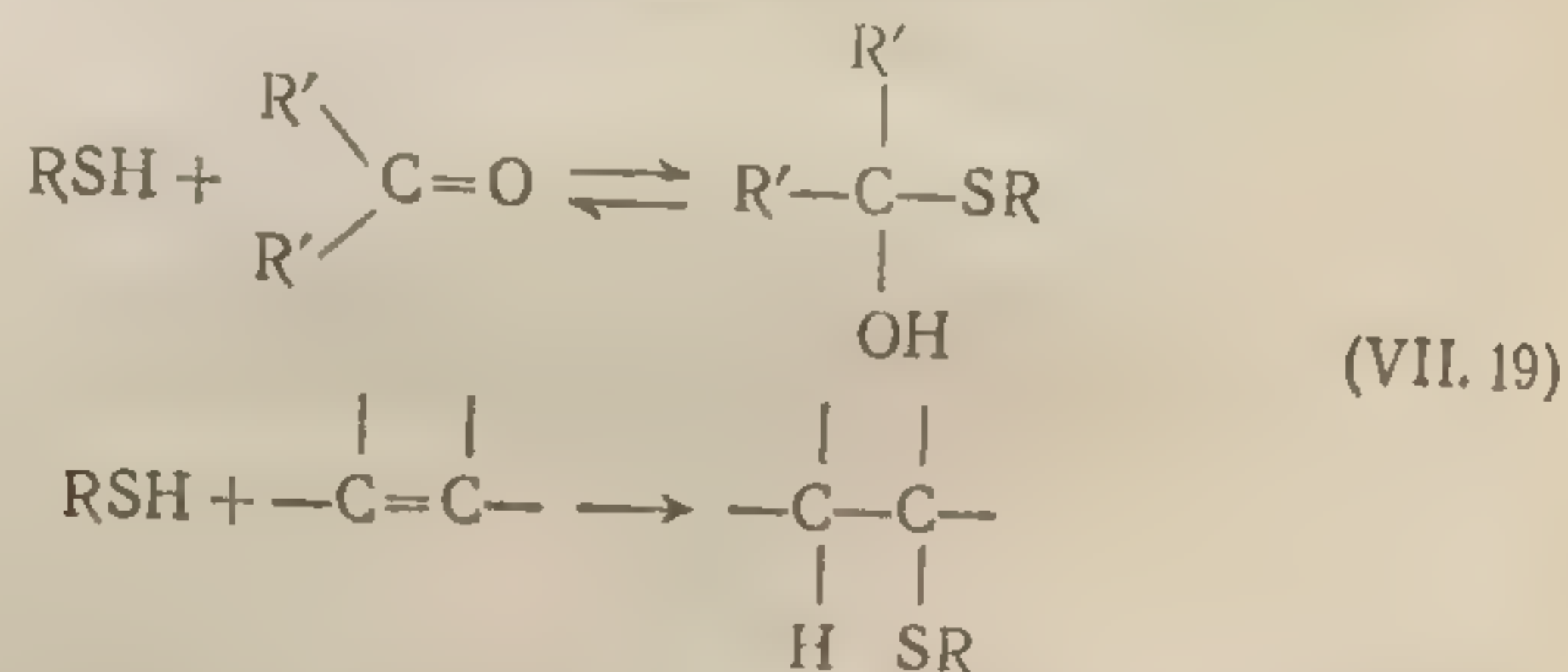
	Карбоксилаза	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{CO}_2 + \text{АТФ} \xrightarrow{\text{Биотин } ^1)} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{CO}_2^-)-\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{АДФ} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$
	Декарбоксилаза	$\text{CH}_2(\text{CO}_2^-)-\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Ацетил-КоА} + \text{HCO}_3^-$
$\alpha$ , $\beta$ -Элиминирование	Ацилдегидрогеназа	$\begin{array}{c}   \quad   \\ -\text{C}-\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} + \text{ФАД } ^2) \longrightarrow \begin{array}{c}   \quad   \\ -\text{C}=\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} \\ \quad \quad \quad   \\ \quad \quad \quad \text{SKoA} \end{array} + \text{ФАД} \cdot \text{H}_2$
$\beta$ -ОН-окисление	$\beta$ -ОН-ацилдегидрогеназа	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ -\text{C}-\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \quad \quad \text{SKoA} \end{array} + \text{НАД}^+ \rightleftharpoons \begin{array}{c} \quad \quad   \\ -\text{C}-\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{SKoA} \\    \quad   \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{SKoA} \end{array} + \text{НАД} \cdot \text{H} + \text{H}^+$

<sup>1)</sup> Кофактор в реакциях, связанных с активацией  $\text{CO}_2$ .

<sup>2)</sup> Флавинадениндинуклеотид, см. разд. 4.

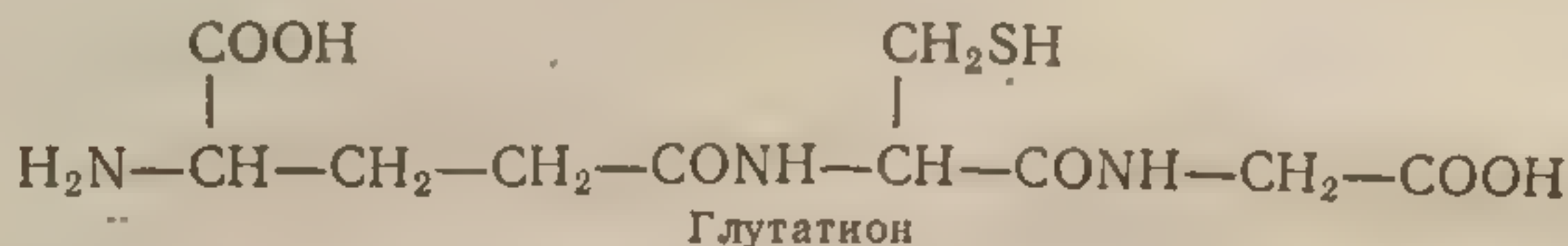


Тиоловые группы обладают также реакционной способностью в реакциях присоединения двух других типов, а именно присоединения к карбонильным соединениям и присоединения по двойной связи

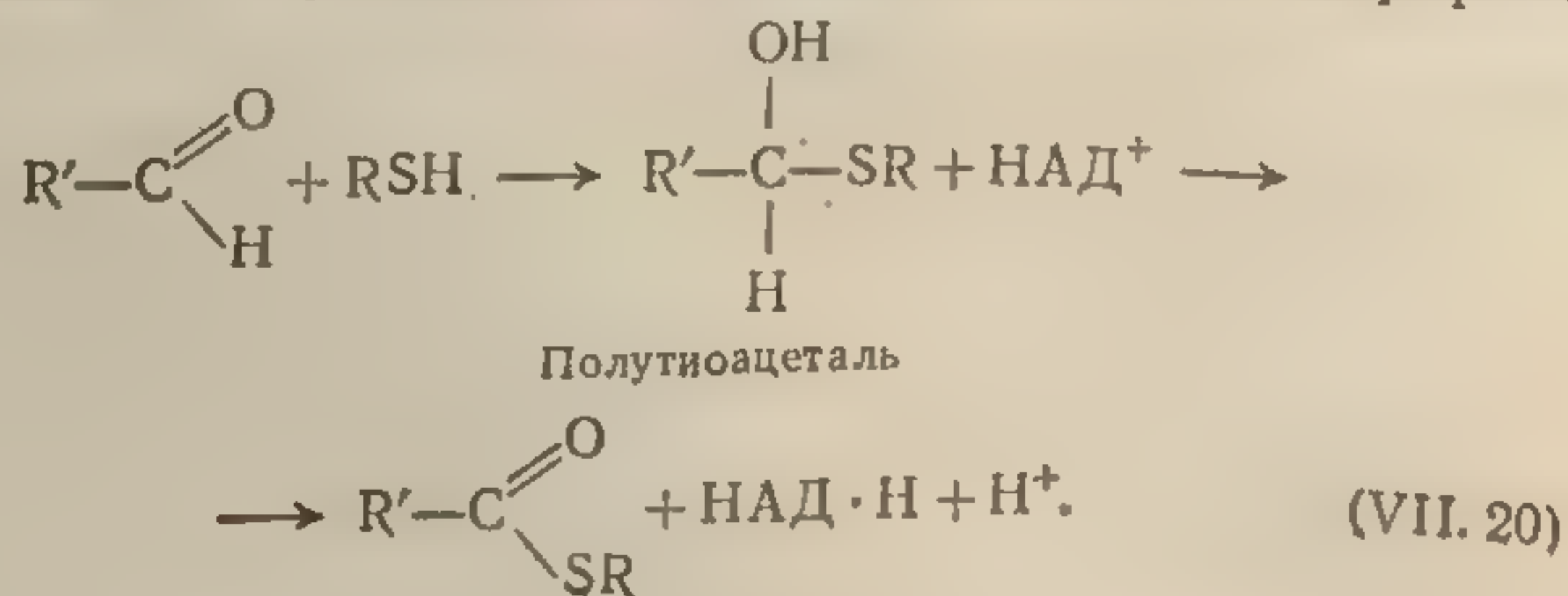


Ни та, ни другая реакция не наблюдаются в ферментативных реакциях с участием КоА. Реакции этого типа осуществляются либо тиоловыми группами остатков цистеина в белковой молекуле фермента, либо какими-нибудь другими тиоловыми коферментами.

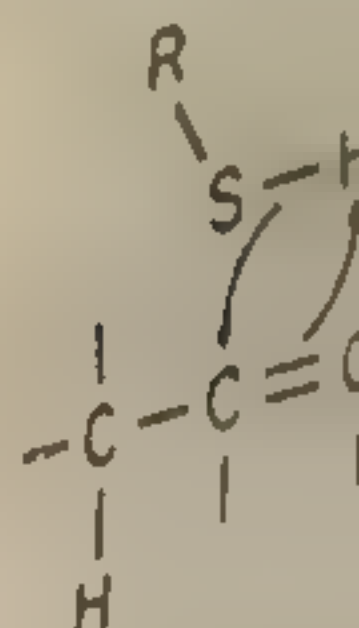
### Глутатион



Упомянутые выше реакции *присоединения* тиолов к альдегидам требуют иногда участия глутатиона. В результате присоединения глутатиона к альдегидам образуются соответствующие полутиоацетали [уравнение (VII. 20)]. Ферменты, использующие глутатион в качестве кофермента, катализируют дальнейшие реакции, приводящие к образованию соответствующих тиоэфиров:



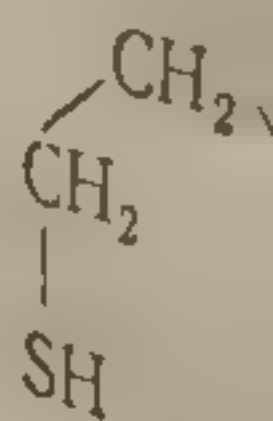
Глутатион  
В присутствии  
рует реакция



В отличие от  
ацильных пр  
талитических  
ограничено с

Как ни с  
тивных про  
кость протек  
вращений [у  
ферментов

Образование  
дит в кофер  
кислоты.

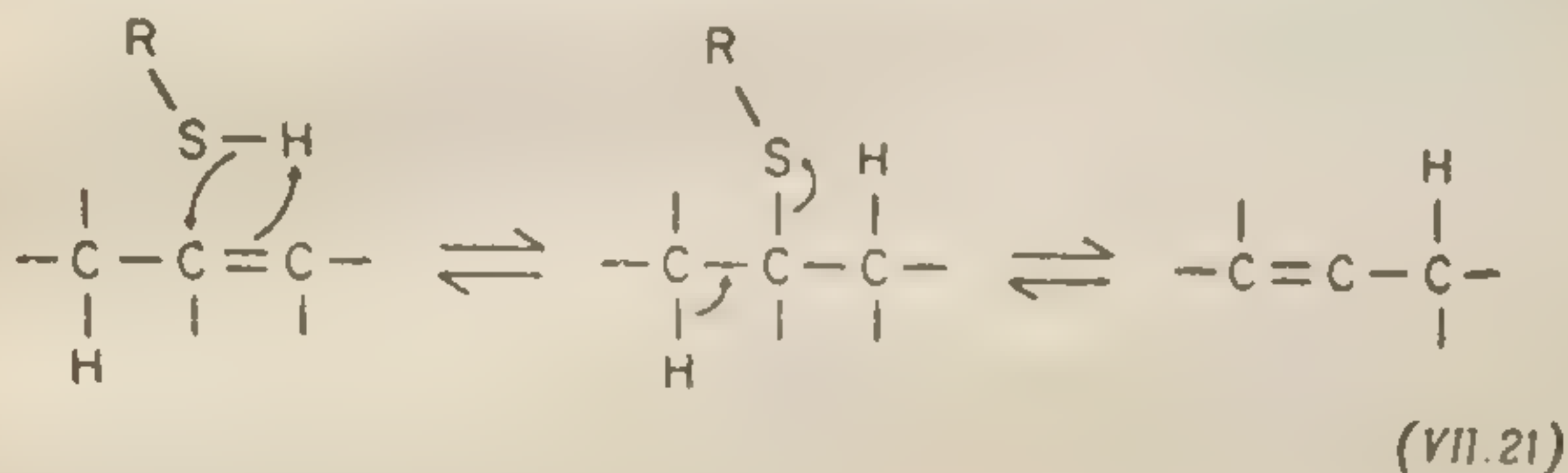


Именно с эт  
реакции окис

<sup>1</sup> Кроме ре  
(VII. 21), с уча  
ферментативные  
единений, напр  
фумарилацетон

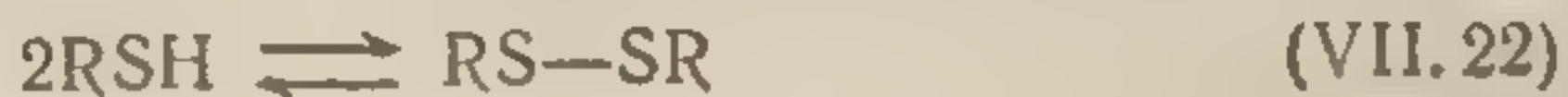


Глутатион обратимо присоединяется к олефинам. В присутствии соответствующих ферментов он катализирует реакции изомеризации двойной связи<sup>1</sup>

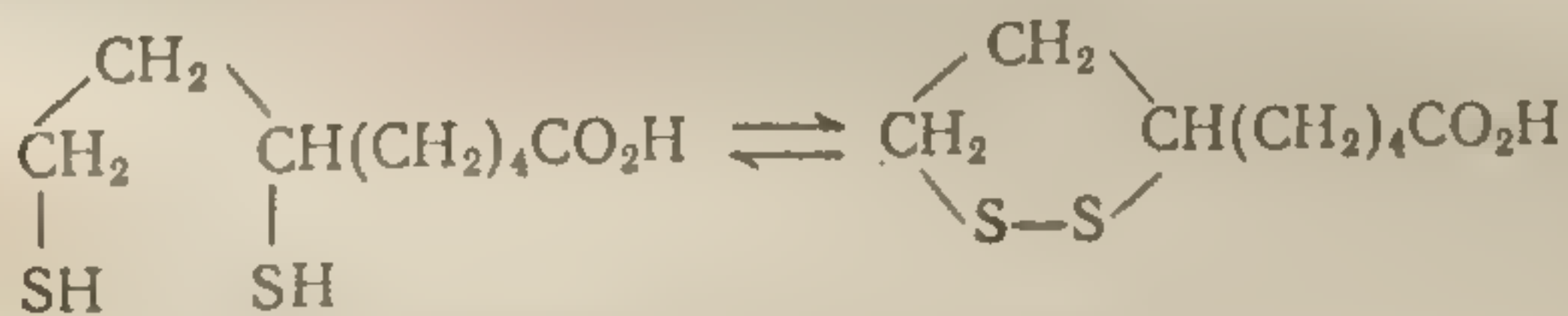


В отличие от кофермента А, участвующего в *переносе* ацильных промежуточных соединений между двумя каталитическими центрами, действие глутаттона обычно ограничено одним каталитическим центром.

Как ни странно, до сих пор не найдено ферментативных процессов, в которых использовалась бы легкость протекания окислительно-восстановительных превращений [уравнение (VII. 22)] этих двух тиоловых коферментов



Образование дисульфидной связи еще легче происходит в коферменте, известном под названием *липоевой кислоты*.



Липоевая кислота

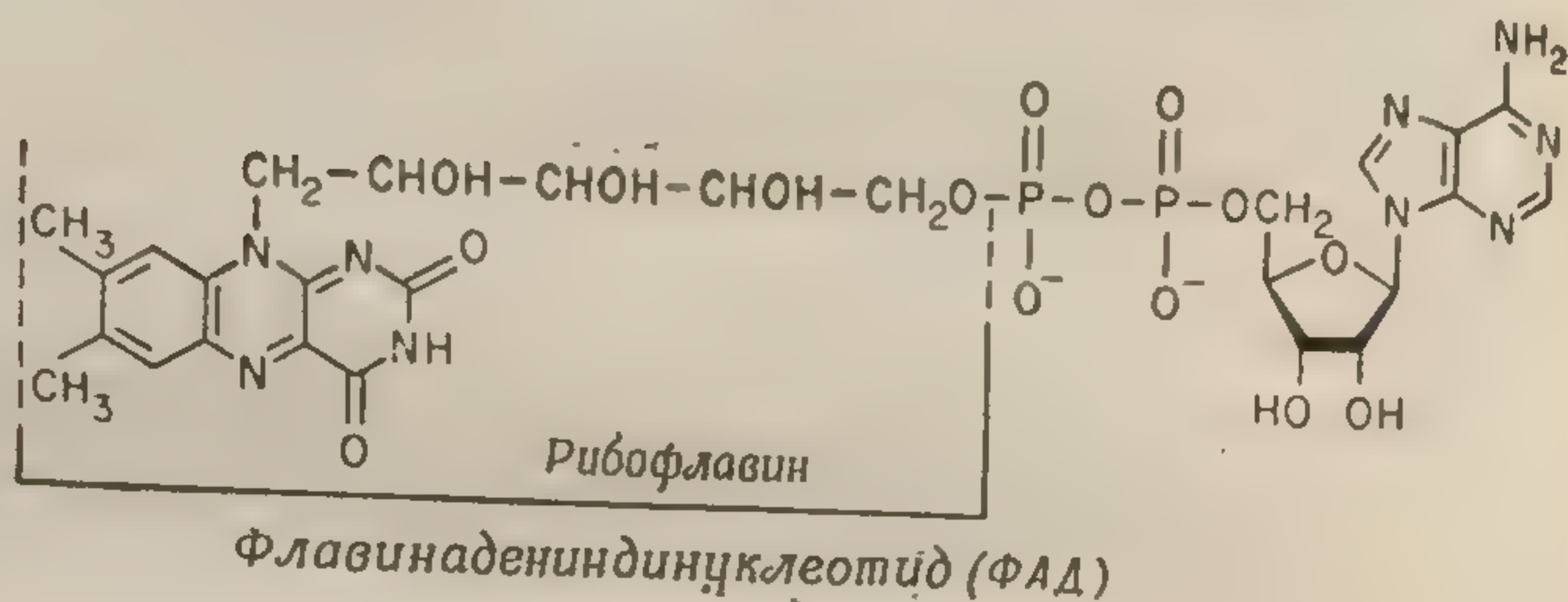
Именно с этим коферментом связаны ферментативные реакции окисления-восстановления, сопряженные с ти-

<sup>1</sup> Кроме реакций перемещения двойной связи по уравнению (VII. 21), с участием глутаттона аналогичным образом протекают ферментативные реакции *цис-транс*-изомеризации непредельных соединений, например взаимопревращение малеиляцетоуксусной и фумариляцетоуксусной кислот, — Прим. ред.

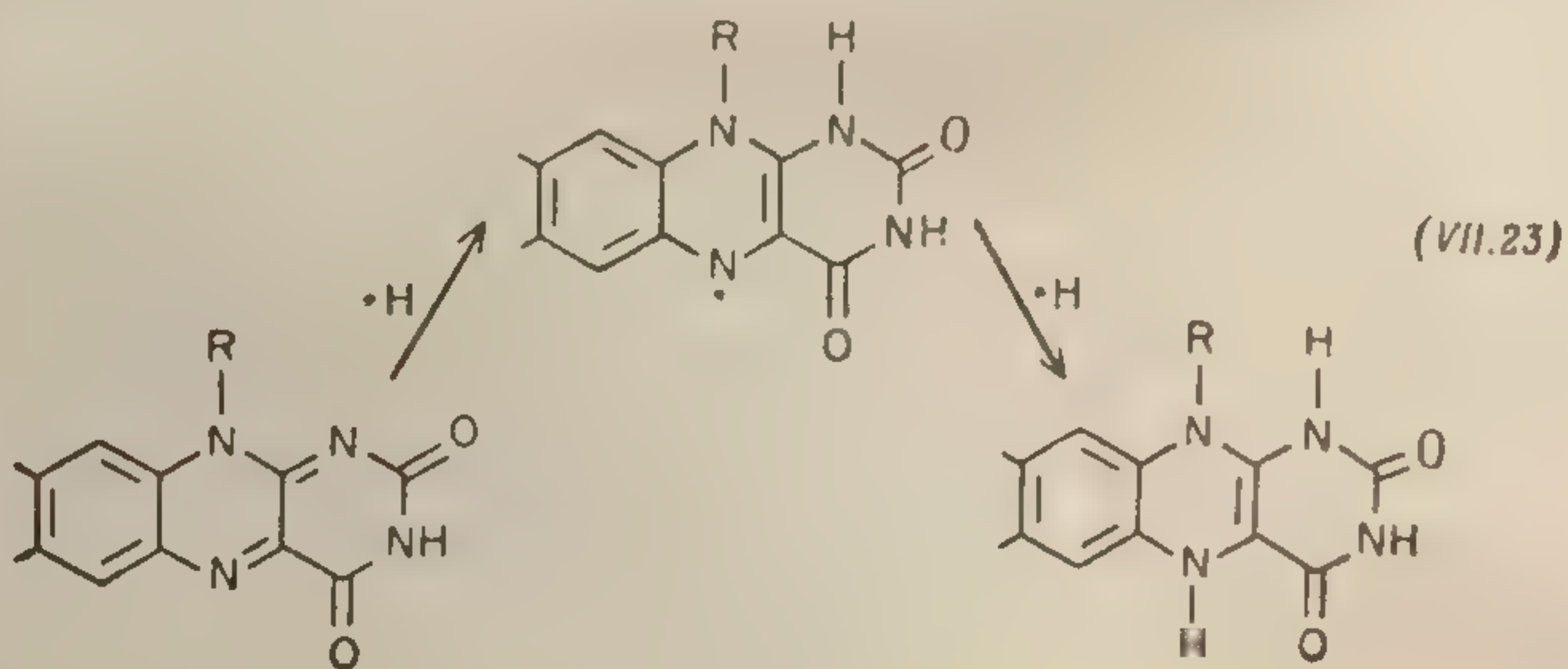


ол-дисульфидным превращением. Молекулярные детали механизма подобных ферментативных реакций, однако, еще совершенно не ясны.

### 5. ФЛАВИНЫ И ГЕМСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

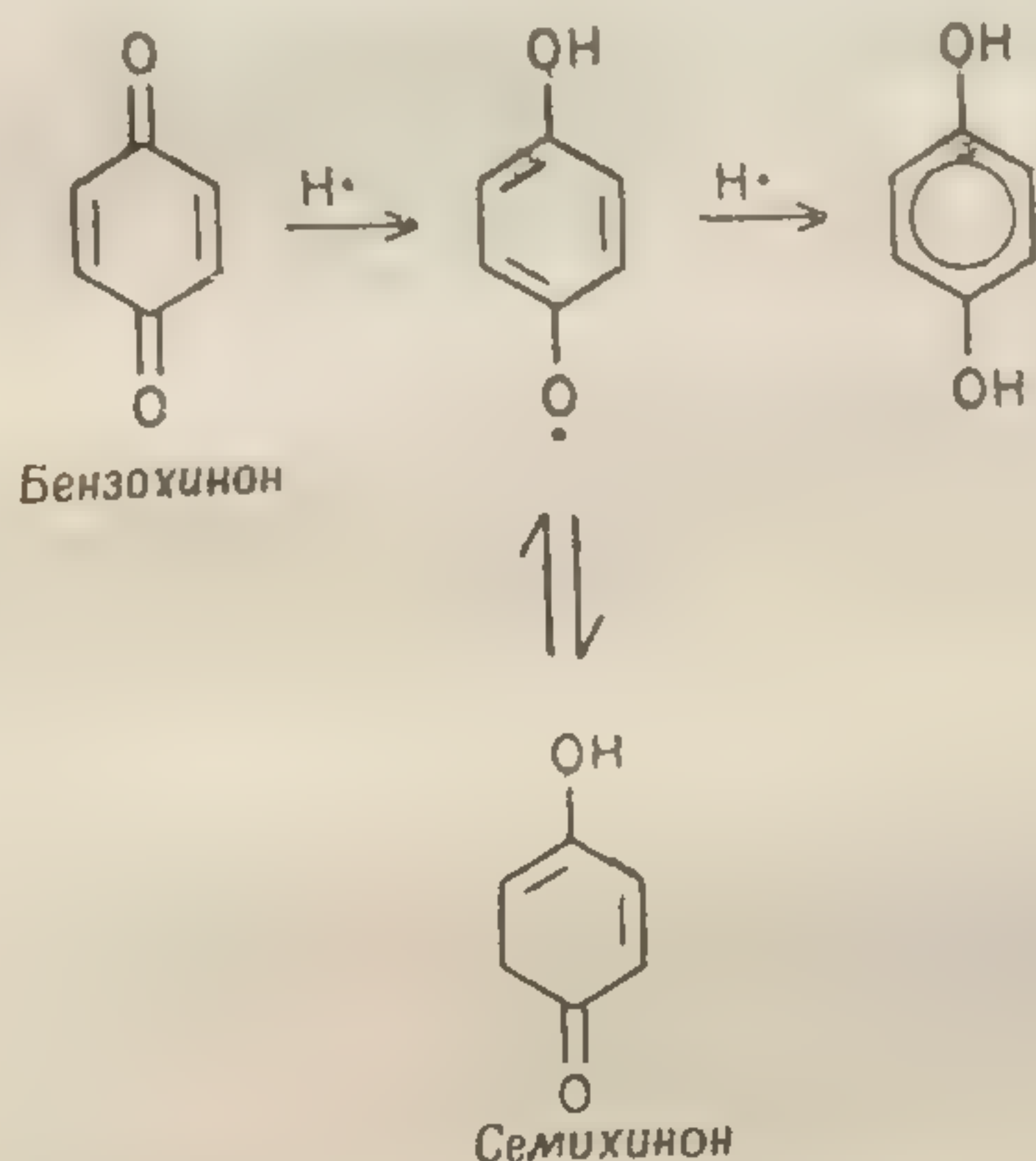


Флавиносодержащие ферменты (флавопротеиды) участвуют во многих важных реакциях биологического окисления. Их основными субстратами являются восстановленные пиридиновые нуклеотиды,  $\alpha$ -амино- и  $\alpha$ -оксикислоты, альдегиды и насыщенные углеродные соединения. Хотя динамике этих окислительных реакций уделялось много внимания, детальный молекулярный механизм их неясен. Изучение модельных систем с флавинами и родственными им соединениями показало, что восстановление флавина происходит в две одноэлектронные стадии:





Промежуточный свободный радикал, образующийся в этой реакции, называют *семихиноном* по аналогии с семихиноном, образующимся из *p*-бензохинона:

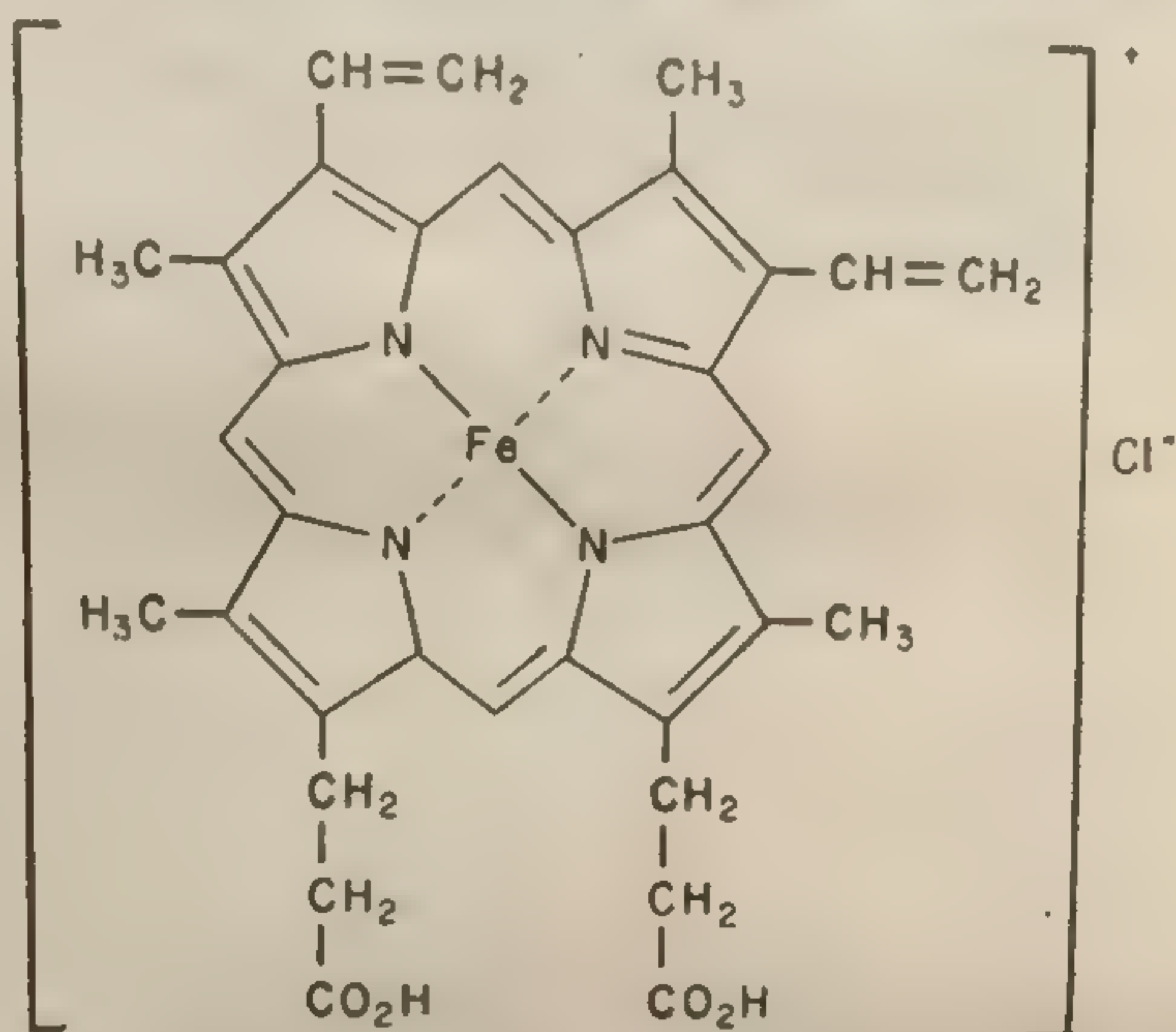


Для обнаружения свободных радикалов измеряют поглощение микроволнового электромагнитного излучения в сильном магнитном поле. С помощью этого метода, называемого методом *электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)*, были обнаружены свободные радикалы при реакциях, катализируемых флавопротендами. В случае флавопротеида *ксантиноксидазы* по спектрам ЭПР обнаруживается второй свободный радикал, образование которого можно объяснить присутствием в качестве кофактора металла переменной валентности — молибдена — и быстротекущим превращением  $\text{Mo}^{6+} \rightarrow \text{Mo}^{5+}$  в процессе катализа. Регистрируемая методом ЭПР кинетика превращения  $\text{Mo}^{6+}$  в  $\text{Mo}^{5+}$  совпадает с кинетикой появления рибофлавинового свободного радикала, что свидетельствует о синхронном механизме. Детали участия субстрата в механизме этой реакции пока не ясны.

Гемсодержащие ферменты имеют важнейшее значение в основных процессах биологического окисления и



окислительного фосфорилирования (сопряжение окисления с образованием макроэргического соединения — АТФ). Для некоторых гемсодержащих белков, например гемоглобина, миоглобина, каталазы и пероксидазы, место и природа взаимодействия гема с субстратом уже установлены. Однако для очень многих процессов



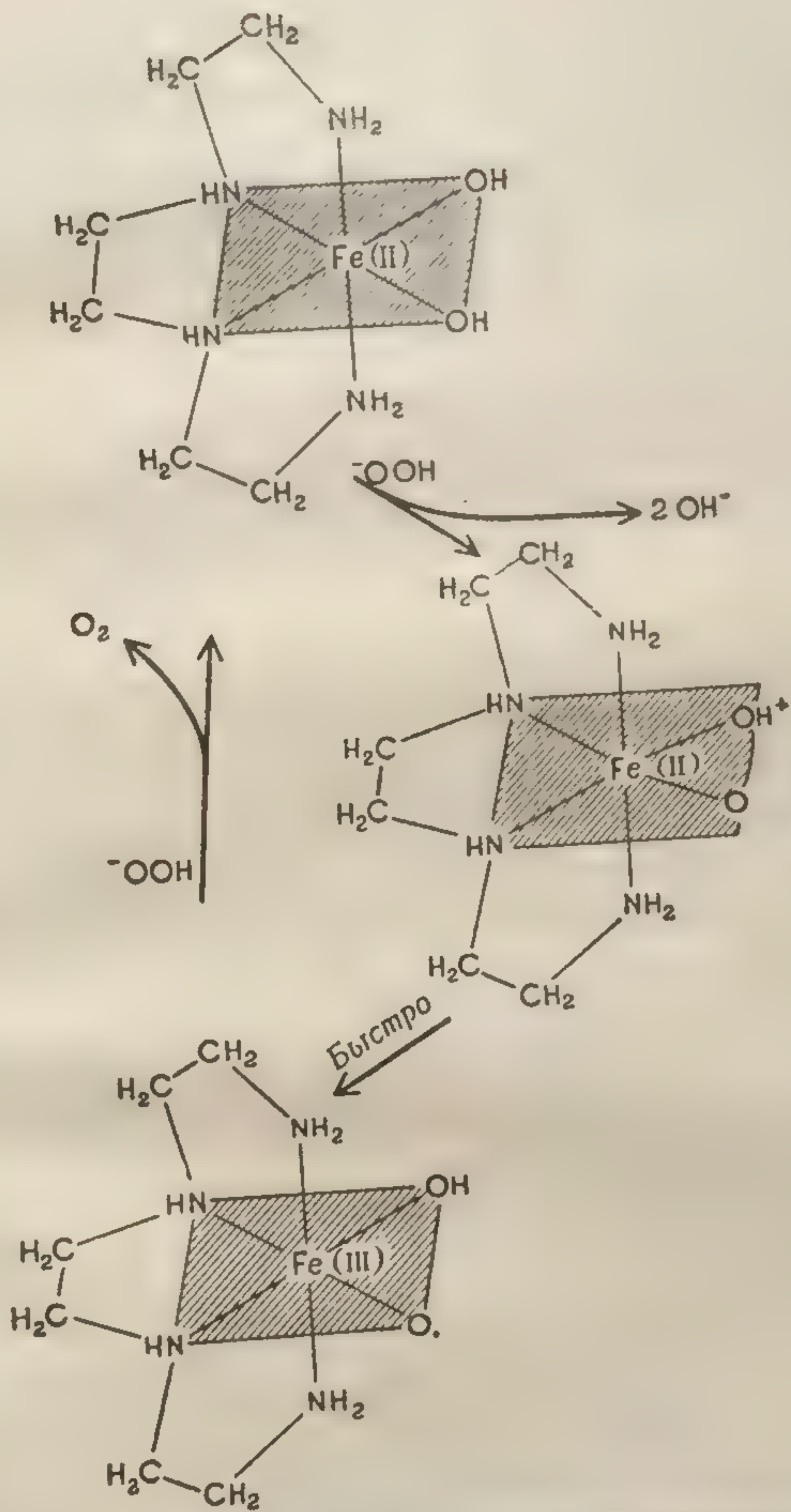
Фиг. 90. Структура гема — железопорфиринового компонента, входящего в состав цитохрома *c*, миоглобина и гемоглобина.

детали взаимоотношения групп гема, субстратов и продуктов реакции остаются совершенно неясными. Общая структура железопорфиринового комплекса, называемого гемом, показана на фиг. 90. Следует обратить внимание, что порфириновое ядро насыщает четыре из шести координационных валентностей атома железа. В гемоглобине и миоглобине, для которых трехмерная структура известна полностью, положения 5 и 6 заняты атомом азота имидазольного кольца, принадлежащего остатку гистидина, и молекулой воды или кислорода.

Изображенный на фиг. 91 клешневидный комплекс железа был предложен в качестве модели действия каталазы. Это соединение обладает каталитической активностью в реакции разложения перекиси водорода.

Фиг. 91. Разрыв связей в молекуле железа.





Фиг. 91. Разрыв связи O—O в молекуле перекиси водорода с образованием молекулярного кислорода, катализируемый клешневидным комплексом железа (предполагаемый механизм) J. H. Wang, J. Am. Chem. Soc., 77, 4715, 1955).



## ЛИТЕРАТУРА

Литература общего характера по механизмам реакций указана в конце гл. VI.

Исчерпывающие общие сведения о коферментах и кофакторах приведены в руководстве *The Enzymes* (Boyer P. D., Lardy H., and Myrbäck K., editors), Vols. 2 and 3, Academic Press, New York, 1960.

Ниже приведены некоторые статьи по роли отдельных кофакторов и коферментов в биологическом катализе:

*Пиридоксальфосфат*

Браунштейн А. Е., Pyridoxal Phosphate, in *The Enzymes*, Vol. 2, p. 113.

Snell E. E., Pyridoxal-Dependent Reactions, in *Enzyme Models and Enzyme Structure*, p. 32, Brookhaven Symposium in Biology, No. 15, 1962.

*Тиаминпирофосфат*

Metzler D. E., Thiamine Coenzymes, in *The Enzymes*, Vol. 2, p. 295.

Breslow R., The Mechanism of Thiamine Catalysis, *Chem. Ind. (London)*, 893 (1957).

Bruice T. C., Benkovic S., *Bioorganic Mechanisms*, Vol. 2, p. 181, Benjamin, New York, 1966.

*Пиридиновые нуклеотиды*

Kaplan N. O., The Pyridine Coenzymes, in *The Enzymes*, Vol. 3, p. 105.

Kosower E. M., Charge-Transfer Complexing of Pyridinium Rings, in *The Enzymes*, Vol. 3, p. 171.

Bruice T. C., Benkovic S., *Bioorganic Mechanisms*, Vol. 2, p. 301.

*Тиоэферы и кофермент А*

Jaenicke L., Lynen F., Coenzyme A, in *The Enzymes*, Vol. 3, p. 3.

Bruice T. C., Benkovic S., *Bioorganic Mechanisms*, Vol. 1, p. 259.

*Глутатион*

Knox W. E., Glutathione, in *The Enzymes*, Vol. 2, p. 253.

*Флавиновые коферменты*

Beinert H., Flavin Coenzymes, in *The Enzymes*, Vol. 2, p. 340.

*Модели геминной простетической группы*

Wang J. H., On the Detailed Mechanism of a New Type of Catalase-like Action, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 4715 (1955).

Wang J. H., The Molecular Mechanism of Oxidative Phosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, 58, 37 (1967).

ФЕРМЕНТАЦИЯ

В этой главе  
которых фермент  
их примере связ  
ские представле  
мами ферментат  
каких-то разумн  
нием всего лишь  
сделан более н  
в первую очередь  
ющейся информа  
ющейся каталит  
шей степени — из  
щих ферментати  
основанные на  
нимы, надо пола  
однако примеры  
исчерпывают вс  
систем.

Для проведе  
ваний необходи  
большое количе  
нии активности  
шими количества  
значительно суж  
было проводить  
Некоторые фер  
легко могут быт  
скольких грамм  
ферментах и пр  
с целью изучен  
ферментов



## ГЛАВА VIII

### ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ КАТАЛИЗ; ХАРАКТЕРНЫЕ ПРИМЕРЫ

В этой главе мы детально рассмотрим свойства некоторых фермент-субстратных систем и попытаемся на их примере связать обсуждавшиеся выше теоретические представления и методы с конкретными механизмами ферментативного катализа. Чтобы не выйти из каких-то разумных границ, мы ограничимся обсуждением всего лишь нескольких ферментов. Выбор их был сделан более или менее произвольно. Мы исходили в первую очередь из количества и многосторонности имеющейся информации (структурной, химической и касающейся каталитических механизмов), а также — в меньшей степени — из биологического значения соответствующих ферментативных реакций. Выводы и обобщения, основанные на рассмотрении этих ферментов, применимы, надо полагать, и к некоторым другим системам; однако примеры, о которых будет идти речь, конечно, не исчерпывают всего разнообразия фермент-субстратных систем.

Для проведения химических и структурных исследований необходимо иметь в распоряжении достаточно большое количество фермента (тогда как при измерении активности фермента можно ограничиться небольшими количествами). В прошлом это обстоятельство значительно сужало круг объектов, с которыми можно было проводить детальные химические исследования. Некоторые ферменты, рассматриваемые в этой главе, легко могут быть получены в количествах порядка нескольких граммов. Именно на таких более доступных ферментах и проводились обстоятельные исследования с целью изучения химических и физических свойств ферментов.



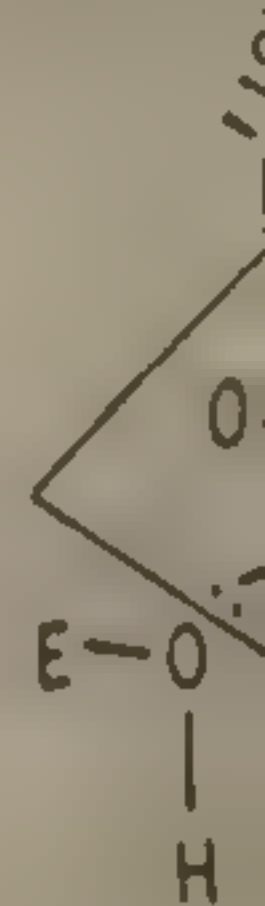
Определенное значение при выборе объектов исследований в области ферментативного катализа имеют и некоторые другие факторы. Среди них особенно важны следующие:

- 1) возможность химического модифицирования определенной группы (или групп) активного центра;
- 2) наличие прочно связанного кофактора и существование методов для его определения;
- 3) детальные данные о каталитическом механизме аналогичных реакций, протекающих в гомогенном растворе;
- 4) доступность кристаллических препаратов фермента;
- 5) наличие набора родственных субстратов (сравнивая скорости их превращений, можно вывести заключения о корреляции между структурой и реакционной способностью);
- 6) существенное значение функции данного фермента для какого-либо важного биологического явления или физиологического процесса.

### 1. $\alpha$ -ХИМОТРИПСИН И ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ С АКТИВНЫМ ОСТАТКОМ СЕРИНА

Протеолитические ферменты *химотрипсин* и *трипсин* выделяют в больших количествах из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Оба эти фермента легко получить в кристаллическом виде в достаточно чистом состоянии и притом по относительно невысокой цене. Неудивительно поэтому, что им уделялось так много внимания. Физиологическая роль этих двух ферментов заключается в гидролизе пептидных связей. Синтезировано большое число модельных субстратов и выяснена субстратная специфичность трипсина и химотрипсина. Стереоспецифичность субстрата отражена на фиг. 92, на которой представлен реакционный центр субстрата.

Требование стереоспецифичности, по-видимому, не распространяется на заместитель X. Оба фермента катализируют гидролиз не только пептидов, но и ряда



Трипсин

$R = CH_2CH_2C$

$CH_2CH_2$

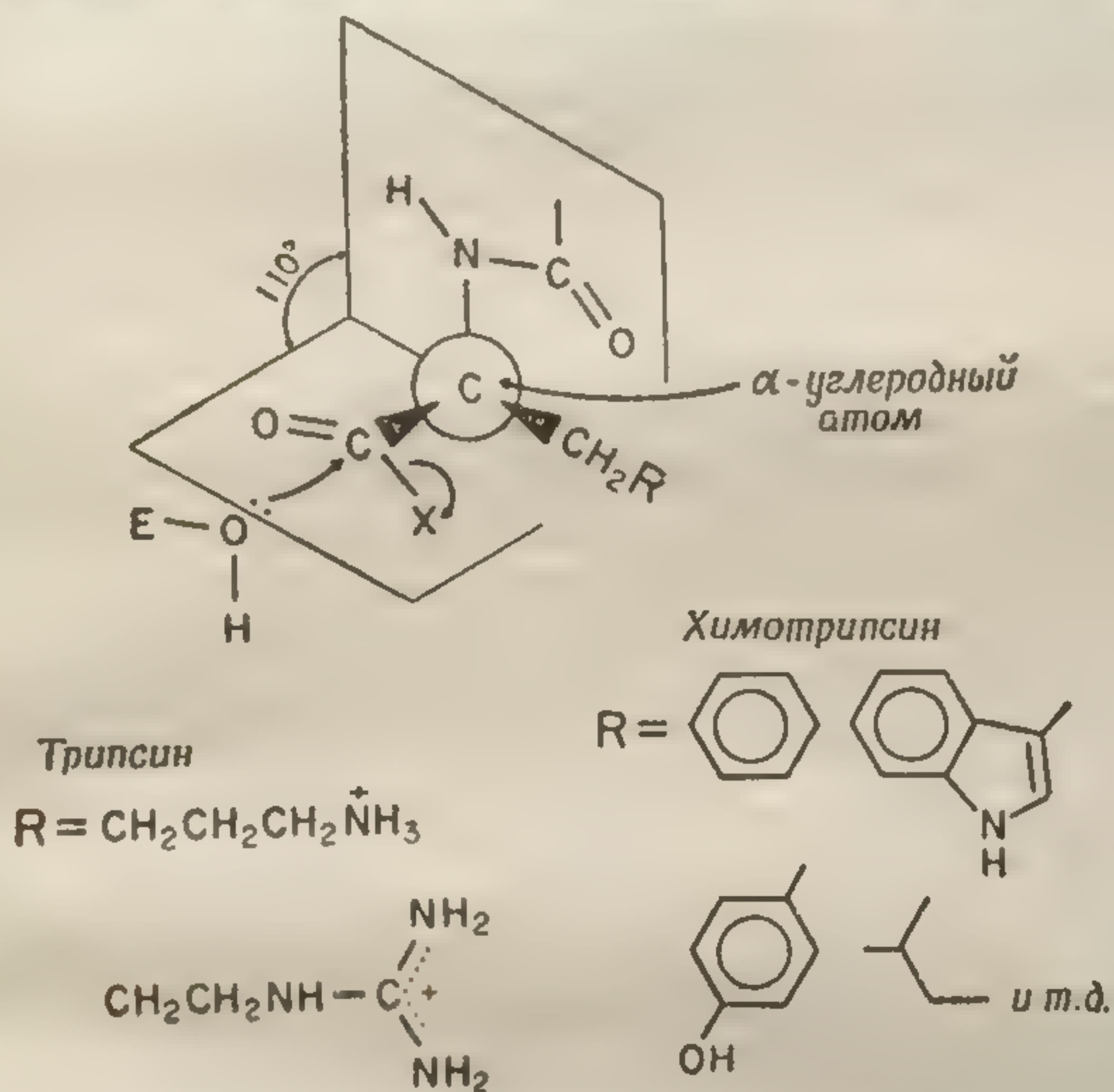
Фиг. 92. Стереоспецифичность

тиоэфиров, ангидридов, скорость ферментативного гидролиза их в растворе. Имеются основания полагать, что катализаторы по каталитической активности в гомогенных и гетерогенных структурная специфичность



других субстратов, содержащих структуры, показанные на фиг. 92.

Изучен гидролиз различных производных N-ацил-аминокислот по карбоксильной группе и получена информация о влиянии электронной структуры заместителя X на реакционную способность. Установлено, что субстратами  $\alpha$ -химотрипсина и трипсина могут служить пептиды, амиды, ангидриды, алкильные и арильные эфиры,



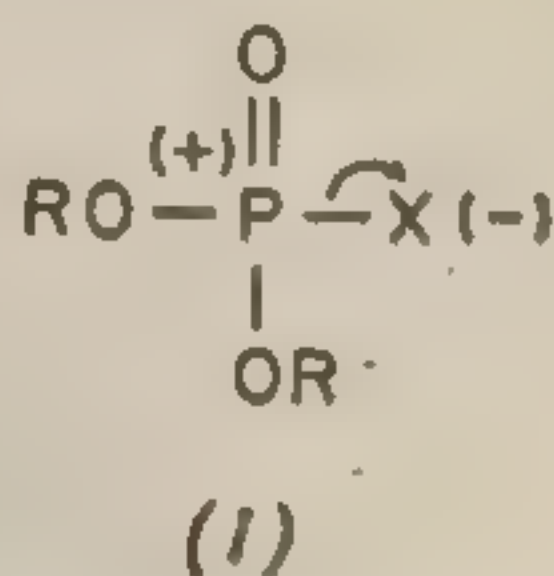
Фиг. 92. Стереоспецифичность субстратов трипсина и химотрипсина.

тиоэфиры, ангидриды и ацилимидазолы. Относительная скорость ферментативного гидролиза рассматриваемых ацилпроизводных качественно коррелирует со скоростью их гидролиза гидроксильными ионами в гомогенном растворе. Имеются, следовательно, некоторые основания полагать, что каталитический механизм может быть истолкован на основе аналогии с многочисленными данными по катализу реакций сольволиза ацилпроизводных в гомогенных растворах. Следует отметить, что структурная специфичность, охарактеризованная на



фиг. 92, не является абсолютной. Нередко субстраты, не обладающие тем или иным признаком указанной структуры, оказываются достаточно реакционноспособными. Это позволяет исследовать, как влияют структурные изменения в различных частях молекулы субстрата на доступность этой молекулы для ферментативного катализа (а также на ее связывание ферментом). Гидролиз практически всех субстратов, имеющих приведенную на фиг. 92 общую структуру, подчиняется классической кинетике Михаэлиса—Ментен; во всех этих случаях наблюдается линейная зависимость  $1/v$  от  $1/S$ , а также насыщение субстратом (см. разд. 1 гл. IV). Известно большое число конкурентных ингибиторов этих ферментов. Все они по своей структуре в какой-то степени сходны с субстратами (фиг. 92), но не имеют реакционного центра. Интересную группу среди этих конкурентных ингибиторов составляют D-изомеры специфических L-аминокислотных субстратов. В отличие от других, необязательных черт структурной специфичности L-конфигурация абсолютно необходима для реакционноспособности субстрата; однако D-изомеры могут прочно связываться с ферментом и конкурентно тормозить реакцию. Абсолютные требования к конфигурации у  $\alpha$ -углеродного атома указывают на строго определенное положение каталитических групп в зоне активного центра фермента.

Хорошо известны необратимые ингибиторы протеолитических ферментов. Важным для теории ферментативного катализа открытием было выяснение механизма ингибирующего действия фосфорорганических эфиров типа (I) на протеолитические ферменты и эстеразы.



Вначале было установлено, что эти соединения специфически и необратимо реагируют с физиологически

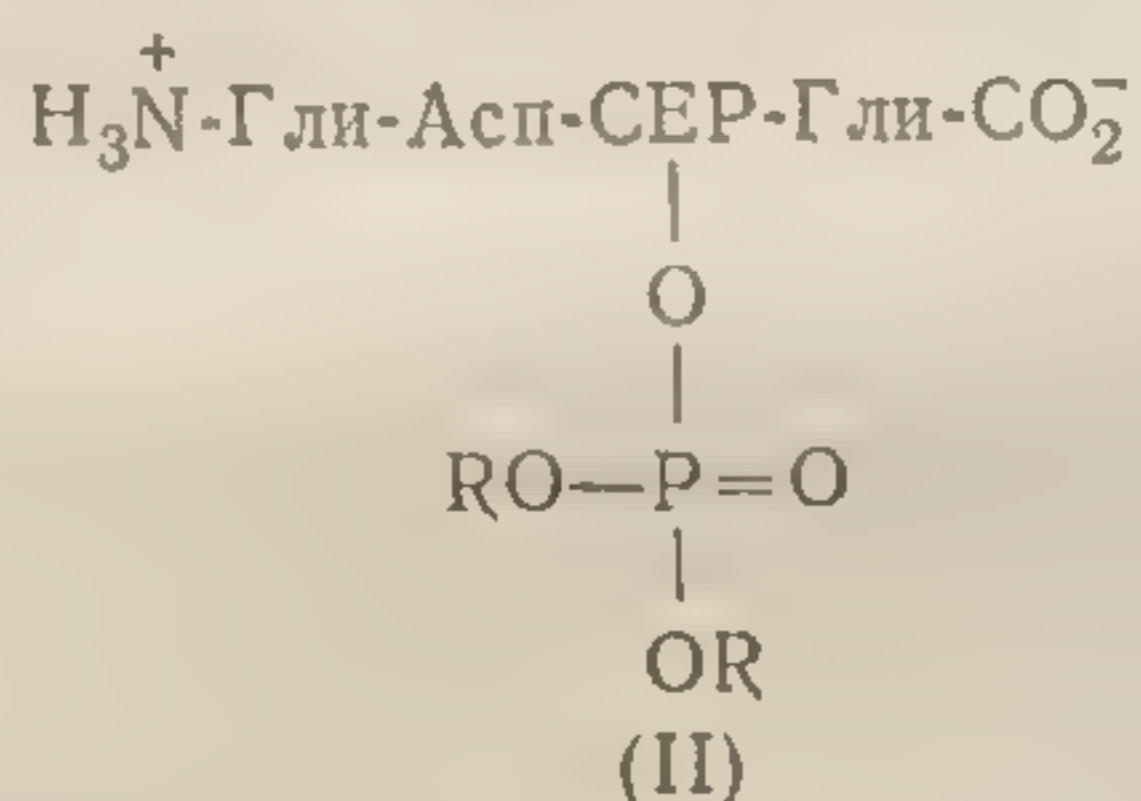
важны ферменты  
позже удаётся  
мое ингибитор  
трипсином.  
Для про  
после реакци  
биторы, мече  
залось, что  
радиоактивно  
том. После де  
го фермента  
фосфориновый

В эксперим  
ческим путем  
кислотного ос  
модействии с  
ного эфира я  
так как ранее  
тализа связан  
мой имидазол  
характер зави  
ные по изучен  
основе химиче  
рами (II) и э  
лировано, что  
ся при необра  
ным аналогом  
промежуточног  
талитической  
ные, подкрепля  
получены в оп  
ровал гидроли



важным ферментом — ацетилхолинэстеразой. Несколько позже удалось показать, что такого же типа необратимое ингибирование наблюдается с химотрипсином и трипсином.

Для прослеживания судьбы фосфорильной группы после реакции с ферментом были использованы ингибиторы, меченные радиоактивным фосфором ( $P^{32}$ ). Оказалось, что в результате реакции один эквивалент радиоактивного фосфора прочно связывается с ферментом. После денатурации и расщепления  $P^{32}$ -содержащего фермента (гл. V) был выделен стабильный  $P^{32}$ -фосфосериновый пептид (II)

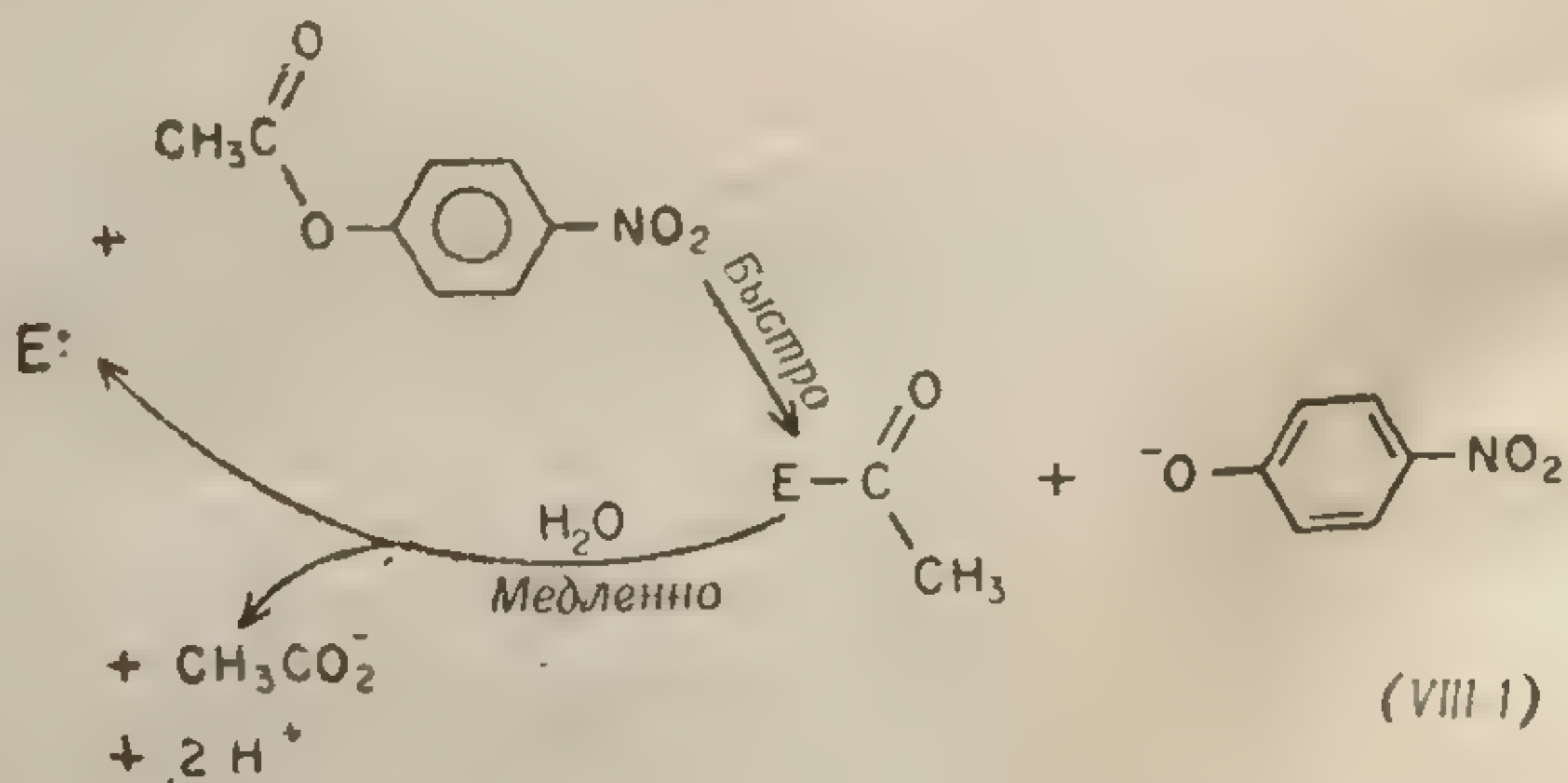


В экспериментах этого рода впервые удалось химическим путем идентифицировать боковую цепь аминокислотного остатка, участвующую в ковалентном взаимодействии с субстратом. Обнаружение О-серинфосфорного эфира явилось в известной мере неожиданным, так как ранее считалось вероятным, что механизм катализа связан с нуклеофильной атакой, осуществляемой имидазольной группой гистидина (на это указывал характер зависимости активности от pH, а также данные по изучению модельных реакций; см. фиг. 69). На основе химического сходства между фосфорными эфирами (II) и эфирами карбоновых кислот было постулировано, что фосфорный эфир фермента, образующийся при необратимом ингибировании, является стабильным аналогом реакционноспособного ацилфермента — промежуточного соединения, образующегося в ходе каталитической реакции с субстратом. Убедительные данные, подтверждающие правомерность этой гипотезы, были получены в опытах, в которых  $\alpha$ -химотрипсин катализировал гидролиз нитрофенилацетата. При относительно



небольшом избытке этого псевдосубстрата (по сравнению с концентрацией фермента) можно наблюдать начальный «выброс» нитрофенола в количестве, примерно соответствующем числу эквивалентов фермента. За «выбросом» следует более медленная стадия гидролиза оставшегося нитрофенилового эфира.

Результаты этих экспериментов совместимы с представлением о быстром образовании ацилфермента, за которым следует его медленный гидролиз, приводящий в конечном счете к регенерации катализатора [см. уравнение (VIII.1)]. Было показано, что если в качестве субстрата использовать добавляемый в избытке нитрофенил-(C<sup>14</sup>)-ацетат, а затем быстро денатурировать белок после реакции «выброса», то можно получить фермент с ковалентно присоединенной C<sup>14</sup>-ацетильной группой. Выделенный пептид, содержащий радиоактивную ацетильную метку, имел такую же последовательность аминокислот, как приведенный выше фосфосериновый пептид (II):

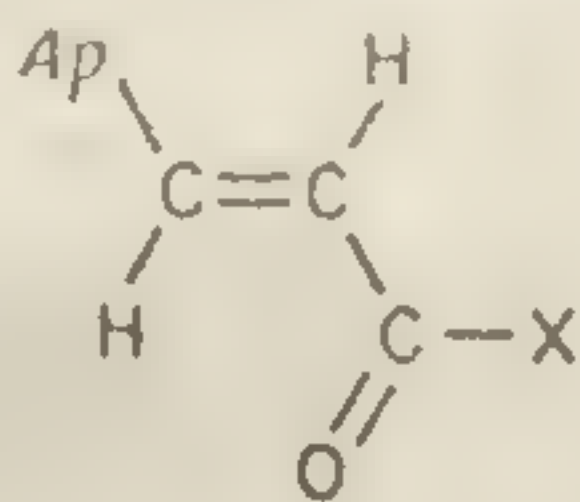


Описанные опыты свидетельствуют о наличии ацильного эфира после денатурации и расщепления. Они, однако, не доказывают ни того, что ацилфермент является единственным промежуточным продуктом в ходе каталитической реакции, осуществляемой нативным ферментом, ни даже того, что он действительно образуется при этой реакции. Для выяснения этого вопроса были синтезированы активные ацилирующие соедине-

Эти соединения бл  
ультрафиолете бл  
женных двойных  
положение их пол  
ной структуры за  
ной ацильной гр  
соединениями дол  
нии ультрафиолет  
реакции. II дейст  
трипсины были о  
ракетному ульт  
Их удалось стаб  
фермента, так ка  
та денатурирова  
гидролизу при н  
Характерные ульт  
мого химическог  
в денатурирова  
роксил серина.  
Имеется, од  
это в остальном  
ванном фермент  
единения. Дело  
хромофорного а  
ром соответству  
ленного ацилпр  
синтетических  
Объяснить это  
тивного центра  
так как различ  
Реакции аци  
можно провес



ния типа III (Ar означает здесь ароматический остаток).



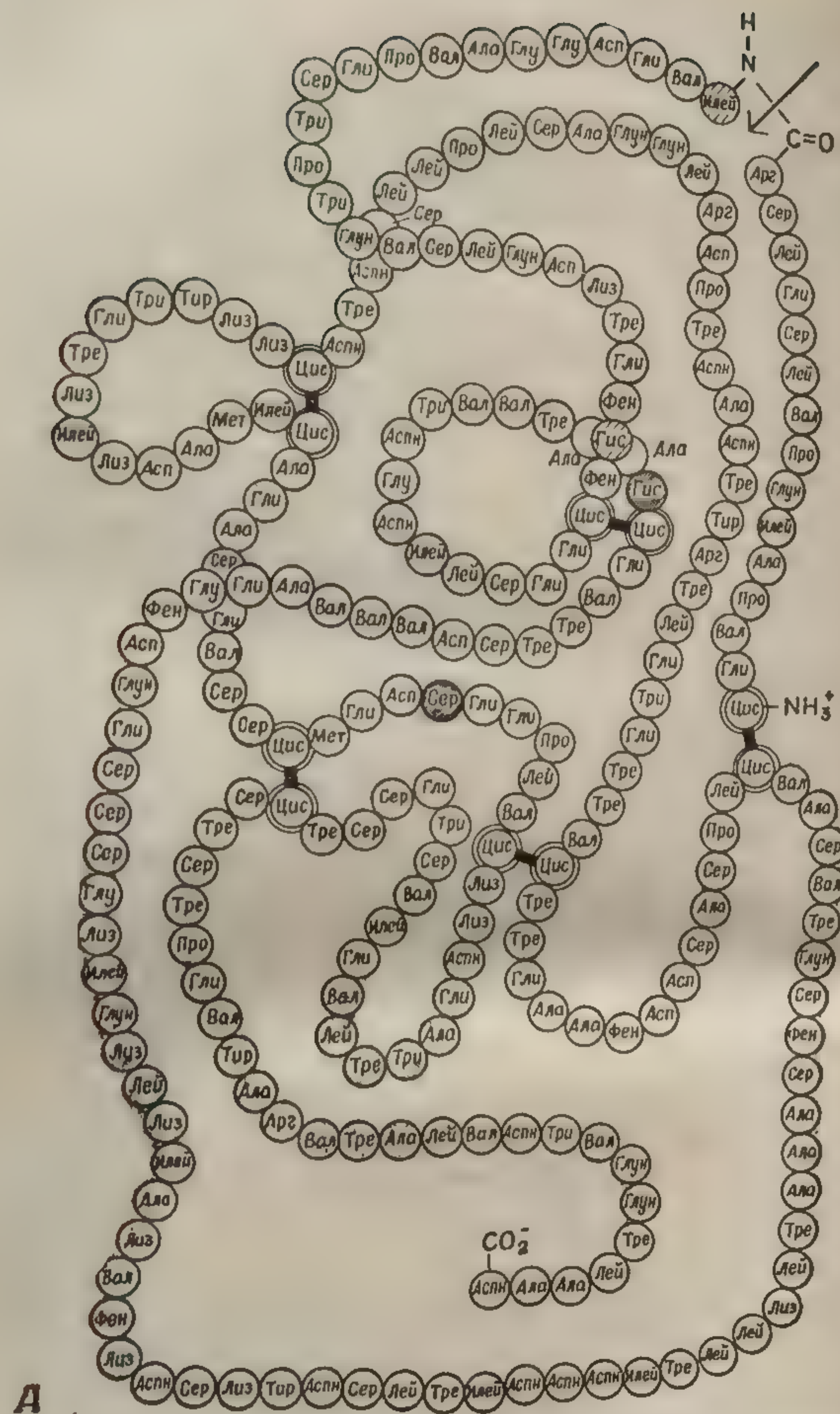
(III)

Эти соединения интенсивно поглощают в ближнем ультрафиолете благодаря наличию нескольких сопряженных двойных связей, и, что особенно существенно, положение их полос поглощения зависит от электронной структуры заместителя (X) при реакционноспособной ацильной группе. Ацилирование фермента этими соединениями должно обнаруживаться при исследовании ультрафиолетовых спектров во время протекания реакции. И действительно, соответствующие ацилхимо-трипсины были обнаружены по их интенсивному и характерному ультрафиолетовому спектру поглощения. Их удалось стабилизировать путем денатурации ацилфермента, так как в отличие от нативного ацилфермента денатурированный не подвергается последующему гидролизу при нейтральном или умеренно кислом pH. Характерные ультрафиолетовые спектры и данные прямого химического анализа убедительно показали, что в денатурированных ацилферментах ацилирован гидроксил серина.

Имеется, однако, одно обстоятельство, нарушающее это в остальном стройное представление об ацилированном ферменте, играющем роль промежуточного соединения. Дело в том, что спектр нативного (активного) хромофорного ацилфермента не совпадает ни со спектром соответствующего денатурированного или расщепленного ацилпроизводного, ни со спектрами небольших синтетических (модельных) О-ацилсериновых эфиров. Объяснить это «эффектом растворителя» в области активного центра нативного ацилфермента, видимо, нельзя, так как различия в спектрах слишком велики.

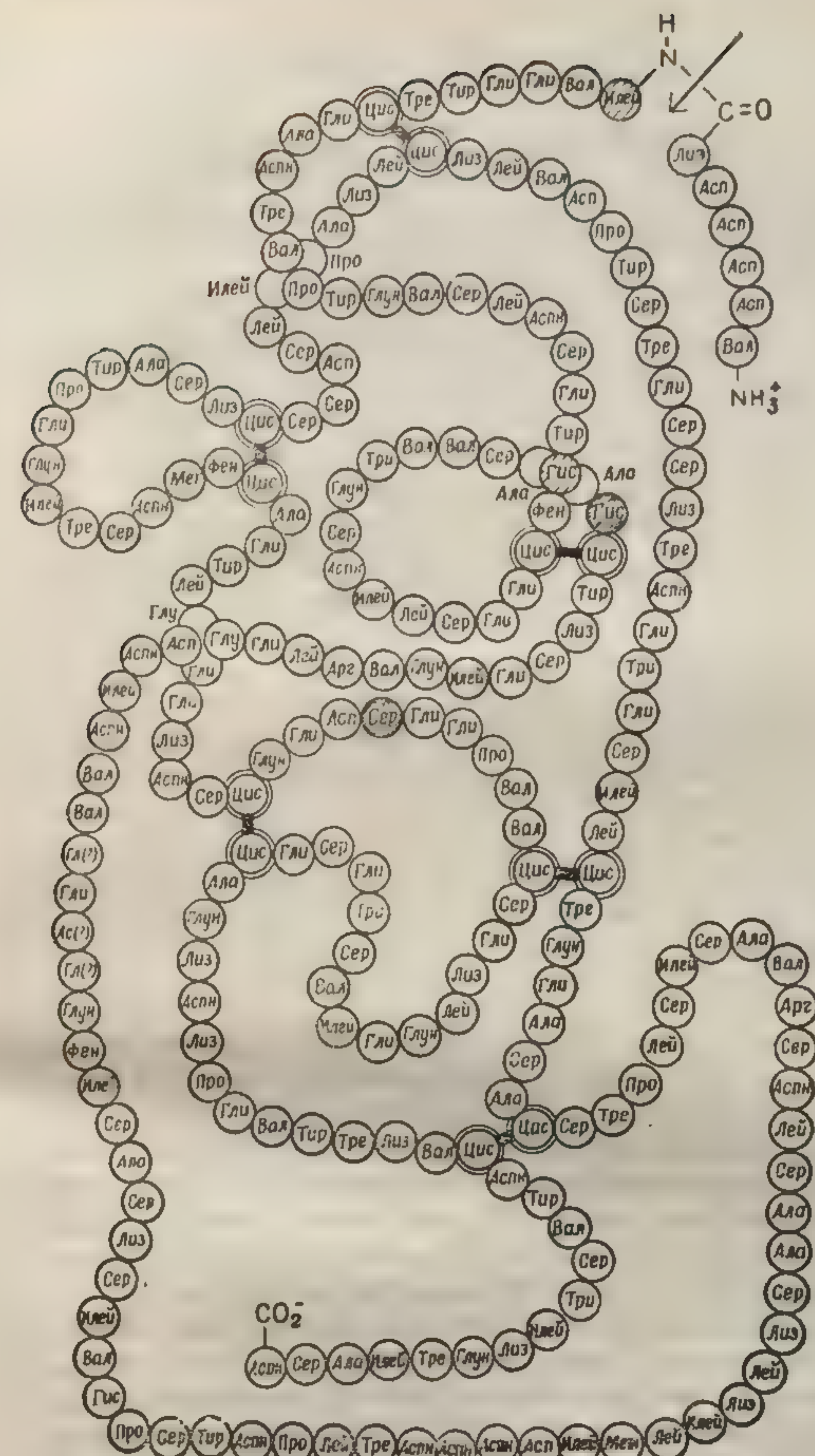
Реакции ацилирования, подобные описанной выше, можно провести и с другими протеолитическими





Ф и г. 93. Первичная структура химо

Стрелки указывают связи, разрываемые (в каждой из этих структур) при акти  
показаны густой штриховкой. Редкой штриховкой обозначены остатки,



5

трипсиногена (А) и трипсиногена (Б).

вазии зимогена. Остатки, играющие решающую роль в каталитическом акте, предположительно имеющие значение для каталитической активности.











ферментами, например с трипсином и субтилизином (бактериальный фермент). Показано, что у всех этих ферментов ацилирование также происходит по остатку серина, обладающему уникальной повышенной реакционной способностью. Спектры нативных ацилферментов, образовавшихся в результате ацилирования соединениями типа III, практически не отличаются от спектров соответствующих нативных ацилхимотрипсинов.

На фиг. 93 показана полная аминокислотная последовательность каталитически неактивных предшественников (зимогенов) — химотрипсиногена и трипсиногена. Активация этих предшественников происходит в результате протеолитического (триптического) гидролиза определенной пептидной связи (на фигуре отмечена стрелкой). Дальнейший быстрый протеолитический гидролиз небольшого числа определенных связей в химотрипсине приводит к образованию ряда многоцепочечных структур (различных форм химотрипсина), лишь незначительно отличающихся одна от другой активностью и субстратной специфичностью. По завершении стадии быстрого протеолиза образуется трехцепочечная структура — активный химотрипсин, обычно обозначаемый как  $\alpha$ -химотрипсин. Недавно полученные данные показывают, что после первой стадии активации зимогена трипсином (фиг. 93) освобождается *существенно*

<sup>+</sup>  
важная  $\text{H}_2\text{N}$ -концевая группа, необходимая для формирования структуры каталитического центра. Образование активного центра, обратимо зависящее от pH, коррелирует с pK протонированной концевой аминогруппы, о чем свидетельствует зависимость от pH констант диссоциации для конкурентных ингибиторов (кривая I на фиг. 94). Зависимость  $V_{\text{макс}}$  от pH при гидролизе специфических субстратов химотрипсина описывается сигмоидальной кривой (кривая II на фиг. 94). При различных концентрациях субстрата график зависимости активности от pH может быть либо колоколообразным, либо сигмоидальным, что определяется степенью насыщения фермента субстратом (pH-зависимая величина). Для большинства фермент-субстратных систем зависимость скорости реакции от концентрации субстрата и

от pH стать дано  
возникает вопрос  
вые, обычно полу  
ложения двух си  
вания субстрата  
Химотрипсин  
тих ферментов.

$\text{K}_m$  или  $\text{K}_i$

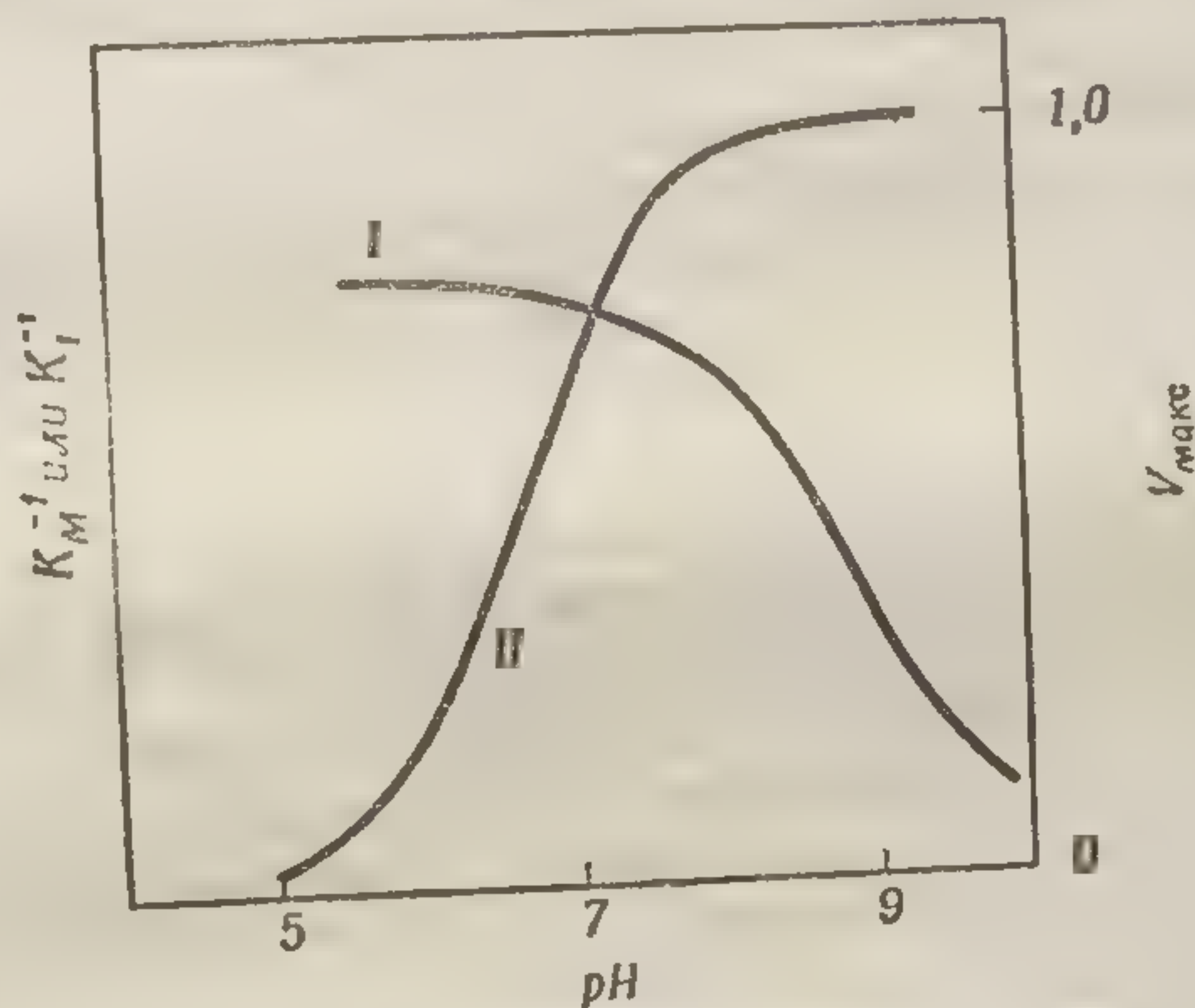
Фиг. 94. Влияние

рость катализ  
мерно в 2 раз  
ных ингибитор  
замене  $\text{H}_2\text{O}$  и  
говорят в поль  
рость процесса  
тализ (поскол  
чем скорость  
эффект наблю  
гидролиза со  
кислот во все  
щей скоростью  
лиз. Следует



от pH столь детально не изучалась. Естественно поэтому возникает вопрос, не являются ли колоколообразные кривые, обычно получаемые для этих систем, результатом наложения двух сигмоидальных кривых — одной для связывания субстрата и другой для каталитической активности.

Химотрипсин и трипсин, подобно большинству других ферментов, активны в тяжелой воде ( $D_2O$ ), но ско-



Фиг. 94. Влияние pH на величину констант сродства ( $K_M^{-1}$  или  $K_I^{-1}$ ) и  $V_{\max}$  для  $\alpha$ -химотрипсина.

I —  $K_M^{-1}$  или  $K_I^{-1}$ ; II —  $V_{\max}$ .

рость катализируемой реакции уменьшается в ней примерно в 2 раза. В то же время связывание конкурентных ингибиторов лишь незначительно изменяется при замене  $H_2O$  на  $D_2O$ . Эти данные также убедительно говорят в пользу того, что стадией, лимитирующей скорость процесса, является общий кислотно-основной катализ (поскольку скорость переноса дейтерона меньше, чем скорость переноса протона). Такой же изотопный эффект наблюдается и при неферментативных реакциях гидролиза соответствующих производных карбоновых кислот во всех тех случаях, когда стадией, лимитирующей скорость, является общий кислотно-основной катализ. Следует подчеркнуть, что тяжелая вода различным



образом влияет на скорость процесса при нуклеофильном имидазольном катализе и при общем кислотно-основном имидазольном катализе. В первом случае, когда свободное основание атакует электрофильный карбонильный углерод, не должно обнаруживаться влияния дейтерия на скорость реакции (по крайней мере в первом приближении), тогда как при общем кислотно-основном катализе перенос дейтерона будет происходить заметно медленнее, чем перенос протона.

В пользу того, что имидазольная группа выполняет каталитическую функцию у рассматриваемых протеолитических ферментов, говорит характер зависимости  $V_{\text{макс}}$  от pH, соответствующий диссоциации одной группы с  $pK_a$  около 7 (что близко к  $pK$  для катиона имидазолия). Прямое доказательство участия имидазола в реакции, катализируемой химотрипсином, было получено в опытах с бифункциональным реагентом тозил-L-фенилаланилхлорметилкетон (гл. V). Приведенные выше соображения свидетельствуют о том, что имидазольная группа (гистидина) участвует в процессе общего кислотно-основного катализа; однако они не исключают и другой возможности — участия имидазола в реакции в качестве нуклеофильного агента.

Мы рассмотрели данные, подтверждающие, что для каталитической активности  $\alpha$ -химотрипсина необходим N-концевой изолейцин, по крайней мере один из двух остатков гистидина (остаток 57) и один остаток серина (остаток 195). Эти остатки локализованы в далеко отстоящих друг от друга участках полипептидных цепей. Имеются также ориентировочные данные, которые позволяют считать, что в катализируемой реакции участвует карбоксильная группа остатка дикарбоновой аминокислоты. В пользу этого говорит характер зависимости каталитической активности и специфичности связывания субстратов от концентрации водородных ионов в кислой области pH. Предположение об участии аспартата (остаток 194) основано лишь на его близости к активному гидроксилу серина (фиг. 93)<sup>1</sup>. Хотя в модельных исследованиях была установлена необычно

<sup>1</sup> См. приложение I.

вызывает реакцию...  
тида (фиг. 73).  
лярных» метаболитов...  
новыми протеолитическими...  
тежна в свете данных...  
бактериальных протект...  
Для изучения...  
сином и трипсином...  
быстро текущих протект...  
ний pH эти реакции...  
вследствие ионизации...  
так что релаксация...  
щими достаточно...  
субстратов и проду...  
ся не удается. В э...  
нимы методы пото...  
со специфическими...  
приемы:  
1. Применение...  
тора в качестве...  
связывающего уча...  
звания хромофо...  
ментом изменяется...  
лит, например, в...  
или трипсином (с...  
профлавин), то п...  
комплекса (в ходе...  
звания конкуре...  
может быть обнар...  
иллюстрирует это...  
2. Применение...  
жизвания измене...  
ходе реакции. Мо...  
сток молекулы с...  
специфически св...  
пример в N-ацил...  
фора чувствитель...  
жения (что обычн...  
то можно просл...  
шении хромофор...  
ферментом (физ



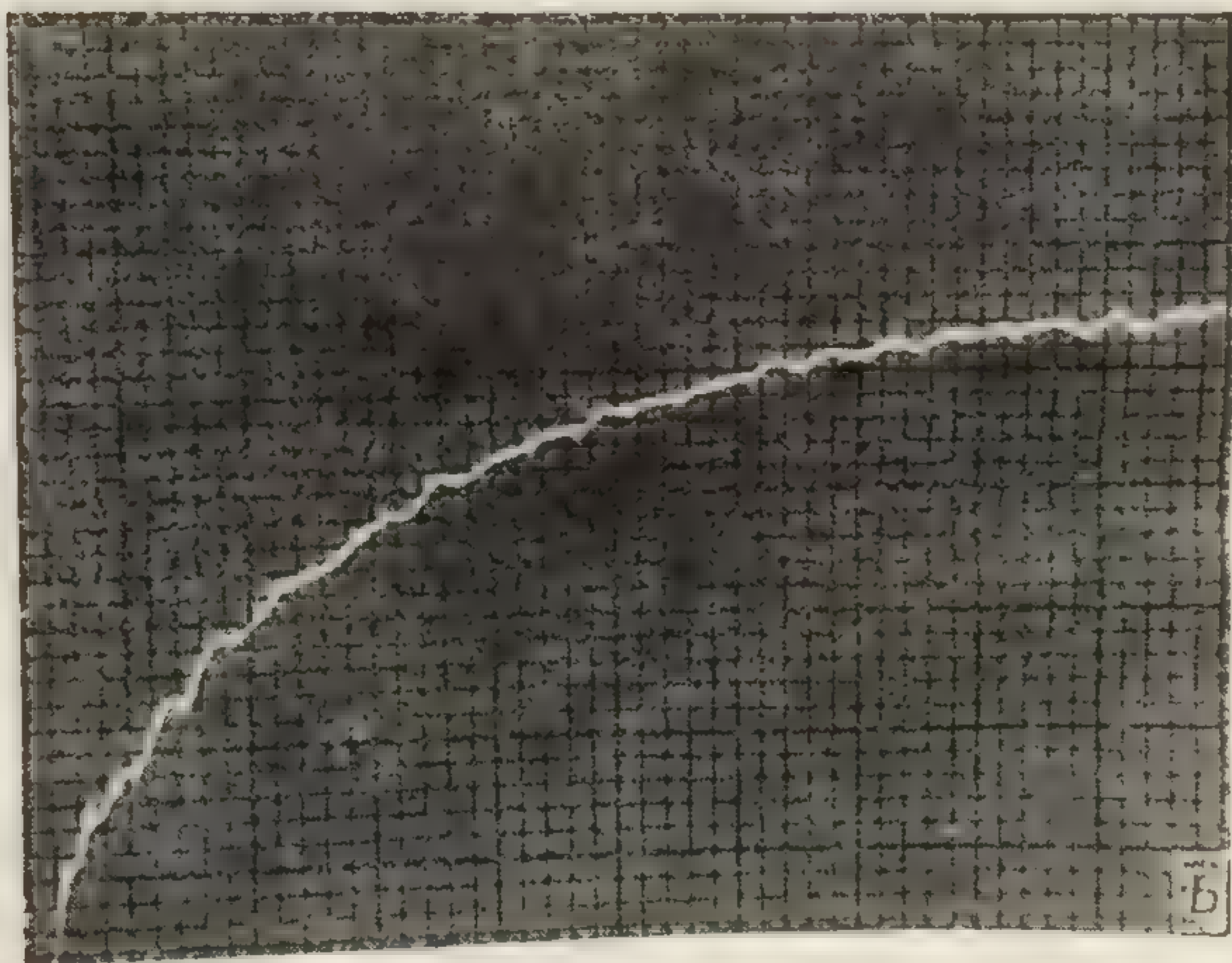
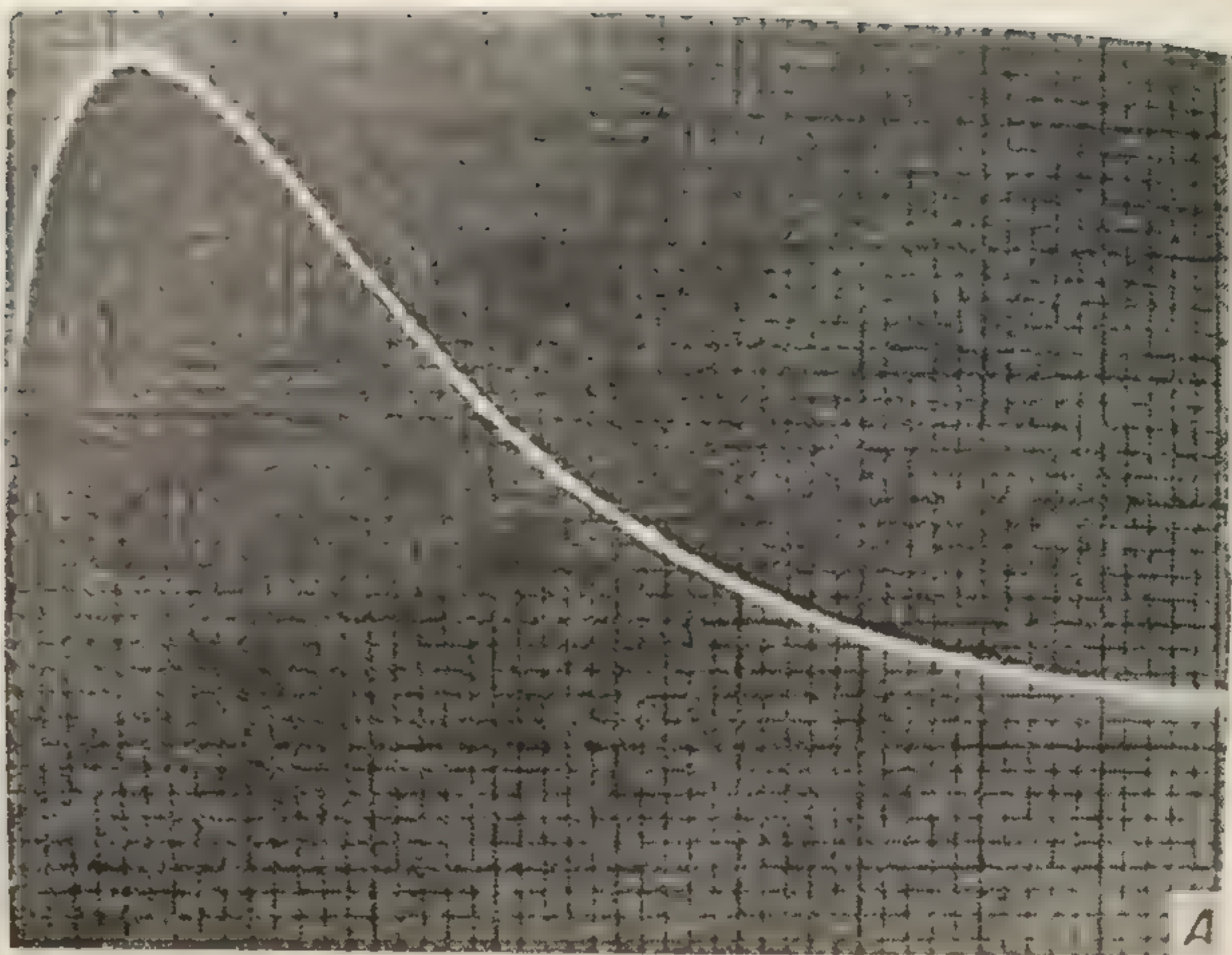
высокая реакционноспособность аспартилсериновых пептидов (фиг. 73), корреляция подобных «внутримолекулярных» моделей с катализом, осуществляемым «сериновыми» протеолитическими ферментами, весьма сомнительна в свете данных, полученных при исследовании бактериальных протеиназ — субтилизинов (см. ниже).

Для изучения реакций, катализируемых  $\alpha$ -химотрипсином и трипсином, применялись методы регистрации быстро текущих процессов. В зоне нейтральных значений pH эти реакции протекают практически до конца вследствие ионизации карбоксильной группы продукта, так что релаксационными методами (гл. IV), требующими достаточно больших равновесных концентраций субстратов и продуктов реакции, обычно воспользоваться не удастся. В этих условиях, однако, вполне применимы методы потока (гл. IV). Для изучения реакций со специфическими субстратами служат следующие приемы:

1. *Применение хромофорного конкурентного ингибитора в качестве индикатора доступности (незанятого) связывающего участка активного центра.* Если при связывании хромофорного конкурентного ингибитора с ферментом изменяется спектр ингибитора (как это происходит, например, в тех случаях, когда с химотрипсином или трипсином связывается акридиновый краситель профлавин), то при диссоциации фермент-субстратного комплекса (в ходе реакции) будет меняться степень связывания конкурентного хромофорного ингибитора, что может быть обнаружено спектрофотометрически. Фиг. 95 иллюстрирует этот метод.

2. *Применение хромофорного субстрата для прослеживания изменений фермент-субстратного сродства в ходе реакции.* Можно ввести хромофорную группу в участок молекулы субстрата, удаленный от того, который специфически связывается с ферментом (фиг. 92), например в N-ациламинозаместитель. Если спектр хромофора чувствителен к влиянию непосредственного окружения (что обычно свойственно сильным хромофорам), то можно проследить изменения спектра при перемещении хромофора из водного раствора в комплекс с ферментом (физическая адсорбция), при последующем





Ф и г. 95. Быстротекущие изменения концентрации комплекса трип-син — профлавин (фермент — конкурентный ингибитор) в ходе реак-ции фермента с субстратом (нитрофениловый эфир карбобензокси-L-лизина) при рН 5,3 и 25°.

А. Большое деление 100 мсек. Б. Большое деление 10 мсек. Изменения величины поглощения (при 470 мкм) свидетельствуют о том, что вначале профлавин десорбируется (вследствие образования ковалентного фермент-субстратного промежуточного соединения), а затем фермент-профлавиновый комплекс появ-ляется вновь по мере образования продукта, обладающего слабым сродством к ферменту.

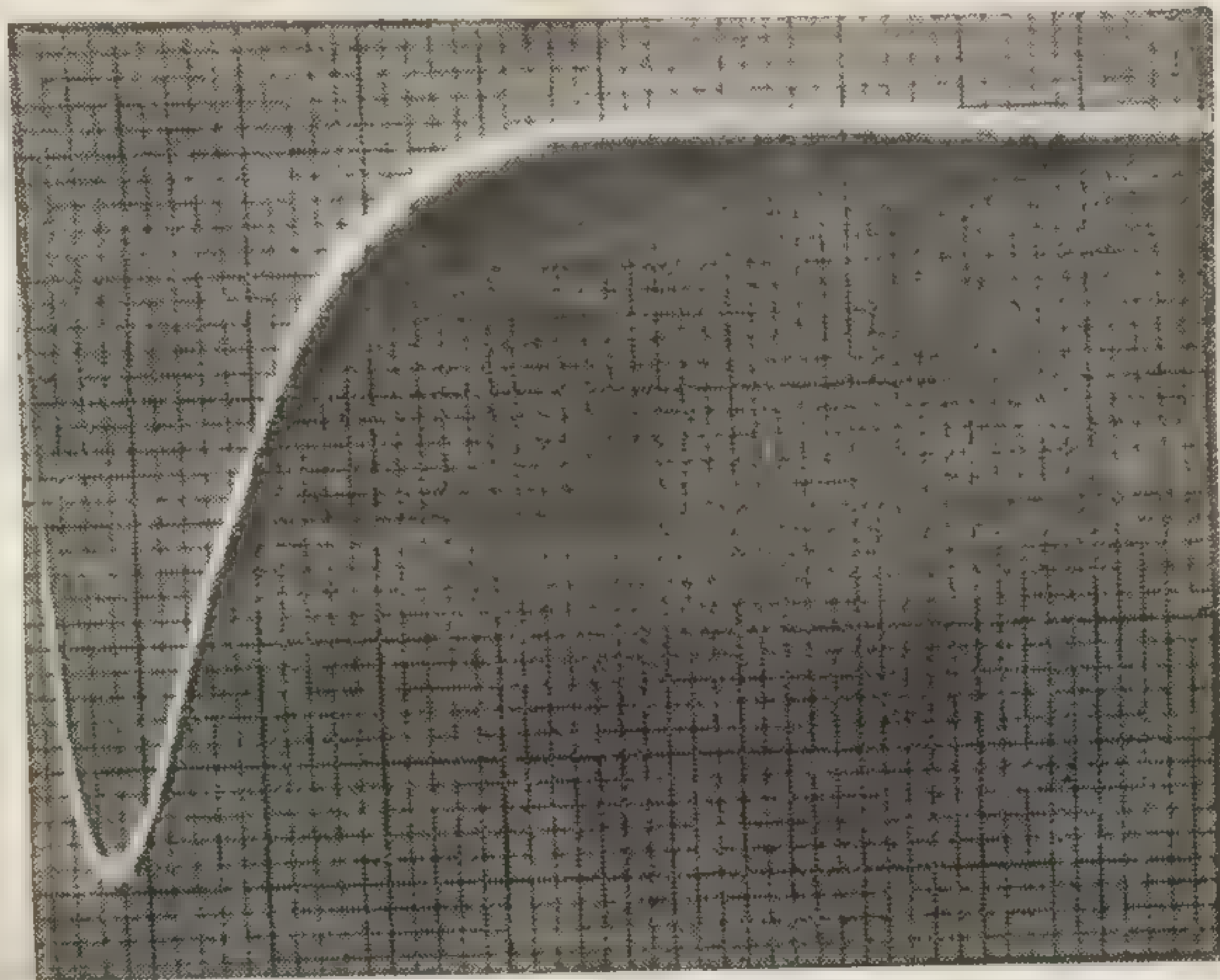
Фиг. 96. Изме-  
нения хромофор-  
ного хромофора  
X-фуриларилон-  
коя трипсин (1)  
Следует отметить (1)  
последова-

3. Обнаруж-  
спектральным  
кой-нибудь су-

дается опре-  
продукта (НХ)  
ния X и скоро-  
вопрос о том

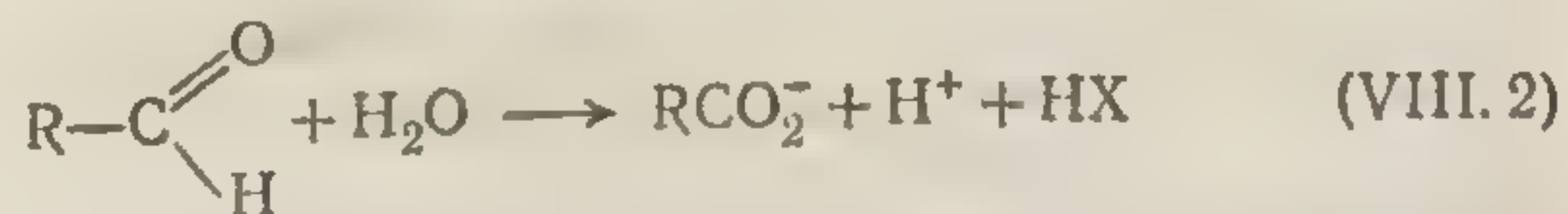


образования химического промежуточного соединения и, наконец, при образовании свободного фермента и хромофорного продукта в водном растворе. Данные такого опыта представлены на фиг. 96.



Фиг. 96. Изменения спектра поглощения  $\beta$ -(2-фурил)-акрилоильного хромофора специфического субстрата, метилового эфира N-фурилакрилоил- L-аргинина, в ходе его взаимодействия с избытком трипсина (pH 5,3; 25°; 330 ммк; большое деление 500 мсек). Следует отметить (так же как и на фиг. 95) наличие по меньшей мере двух последовательных быстротекущих химических процессов.

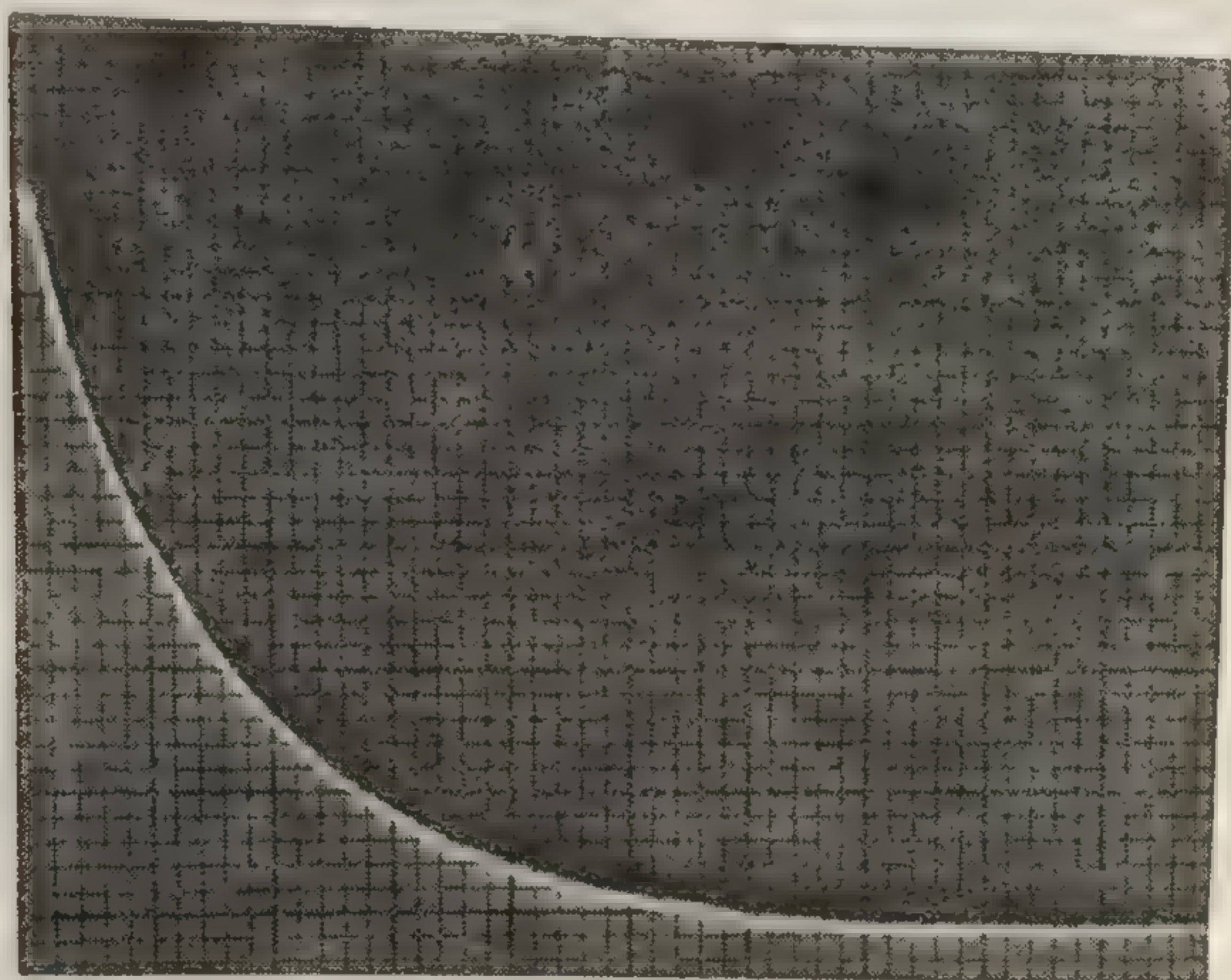
3. Обнаружение одного из продуктов реакции по спектральным или химическим свойствам. Если для какой-нибудь суммарной реакции



удается определить независимым методом количество продукта (HX), то сопоставление скорости освобождения X и скорости убыли субстрата может дать ответ на вопрос о том, образуются ли в ходе каталитического



процесса промежуточные соединения. Например, согласно ацилферментной гипотезе, продукт X должен появляться одновременно с образованием ацилфермента, тогда как скорость убыли субстрата будет зависеть как от скорости образования ацилфермента, так и от скорости



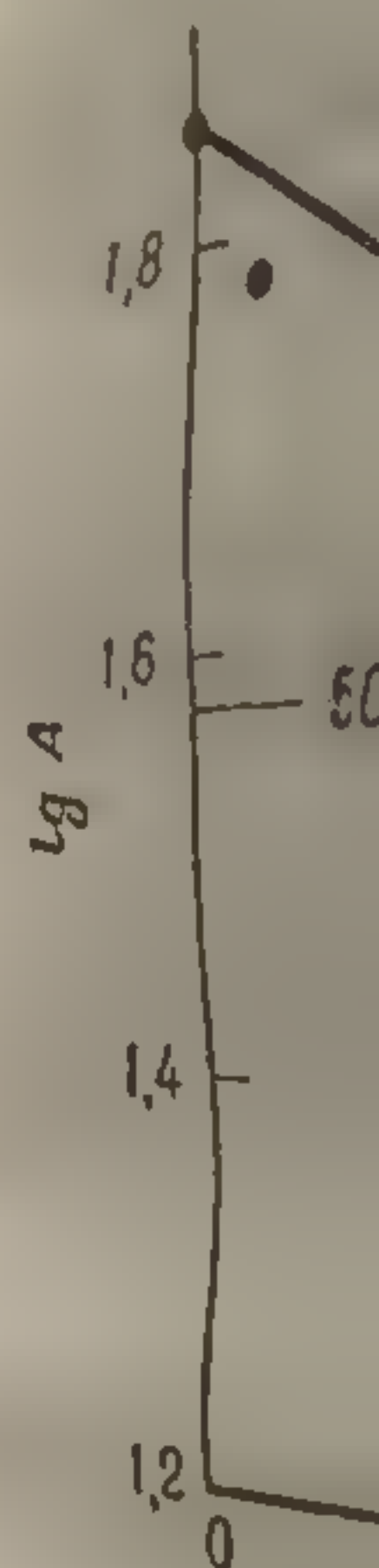
Фиг. 97. Освобождение *p*-нитрофенола в системе, к которой относится фиг. 95 (рН 5,3; 25°, 340 мк; большое деление 50 мсек). Следует обратить внимание на различие в значениях постоянной времени по сравнению с фиг. 95.

его распада. Этот метод используется в тех случаях, когда один из продуктов реакции может быть определен либо спектрофотометрически, либо прямым химическим анализом (фиг. 97 и 98).

Заклучения о механизме реакции, основанные на изучении быстroteкущих реакций, отнюдь не являются исчерпывающими; однако совершенно очевидно (в частности, даже из примеров, приведенных на фиг. 97 и 98), что число последовательных стадий, через которые проходит реакция, больше, чем следует из гипотезы ацилирования фермента. По-видимому, из нековалентного фермент-субстратного комплекса ES обратимо и с из-

мерной скоростью  
одно фермент-субстратный комплекс (ES):  
 $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$

Постулировать существование промежуточного соединения

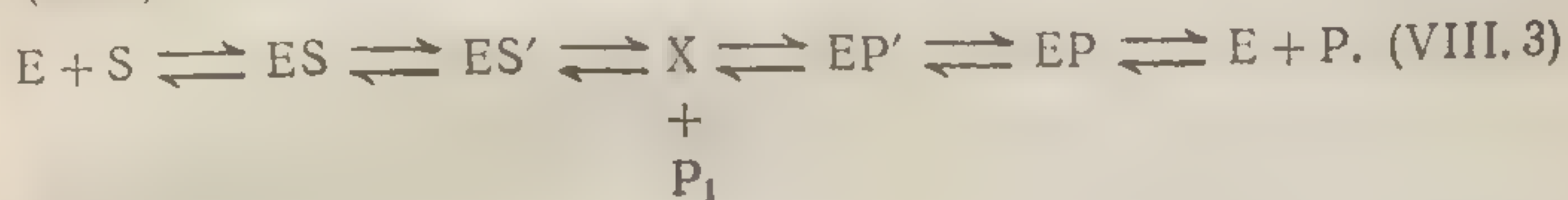


Фиг. 98. Освобождение бензоил-L-аргинина. Длинная черточка на оси

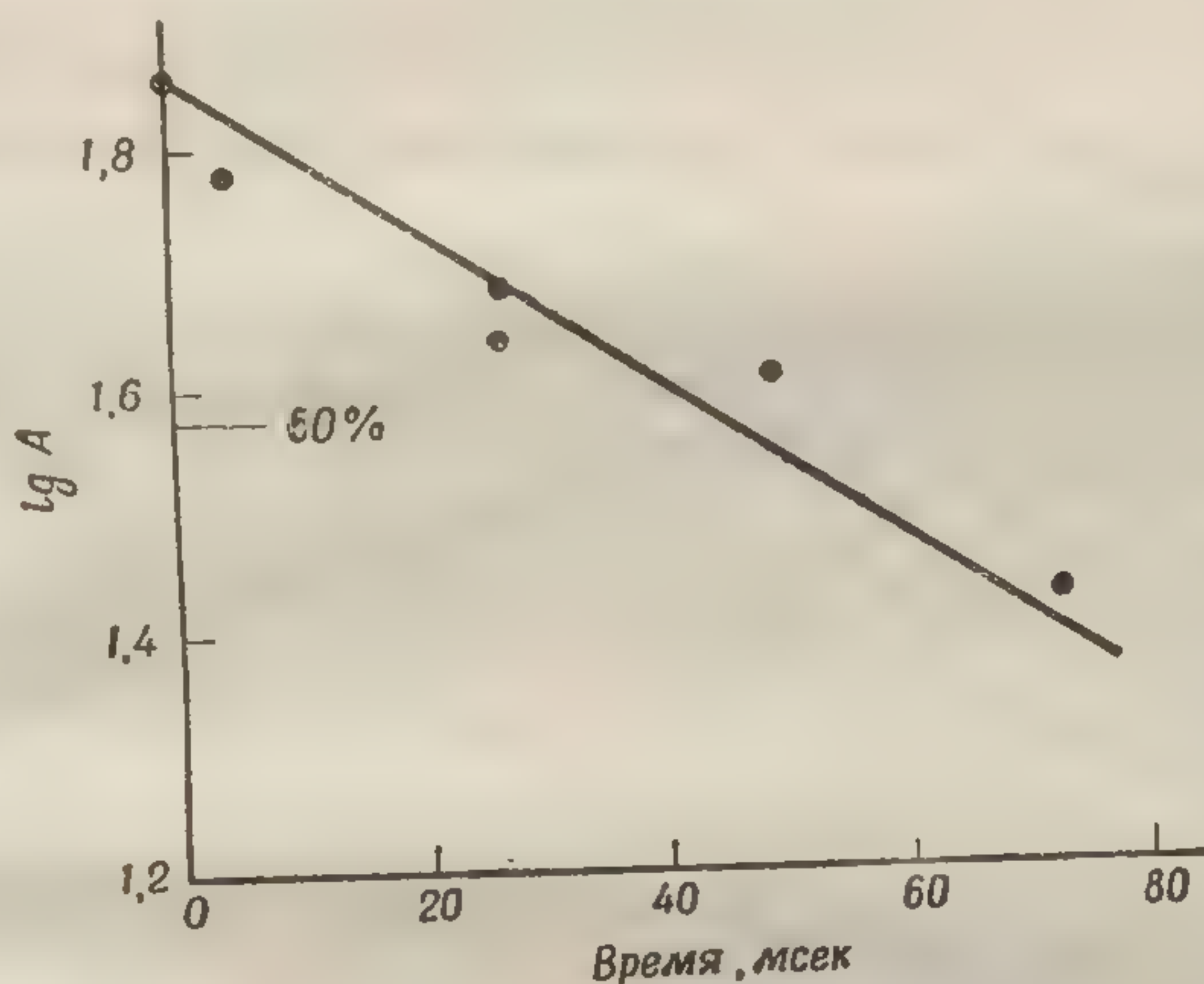
во-первых, характерной для одной из стадий (фиг. 97) может быть определена скорость хромофорной группы, что позволяет предположить возможность



меримой скоростью образуется по крайней мере еще одно фермент-субстратное промежуточное соединение (ES'):



Постулировать существование этого второго промежуточного соединения (ES') необходимо; на это указывает,



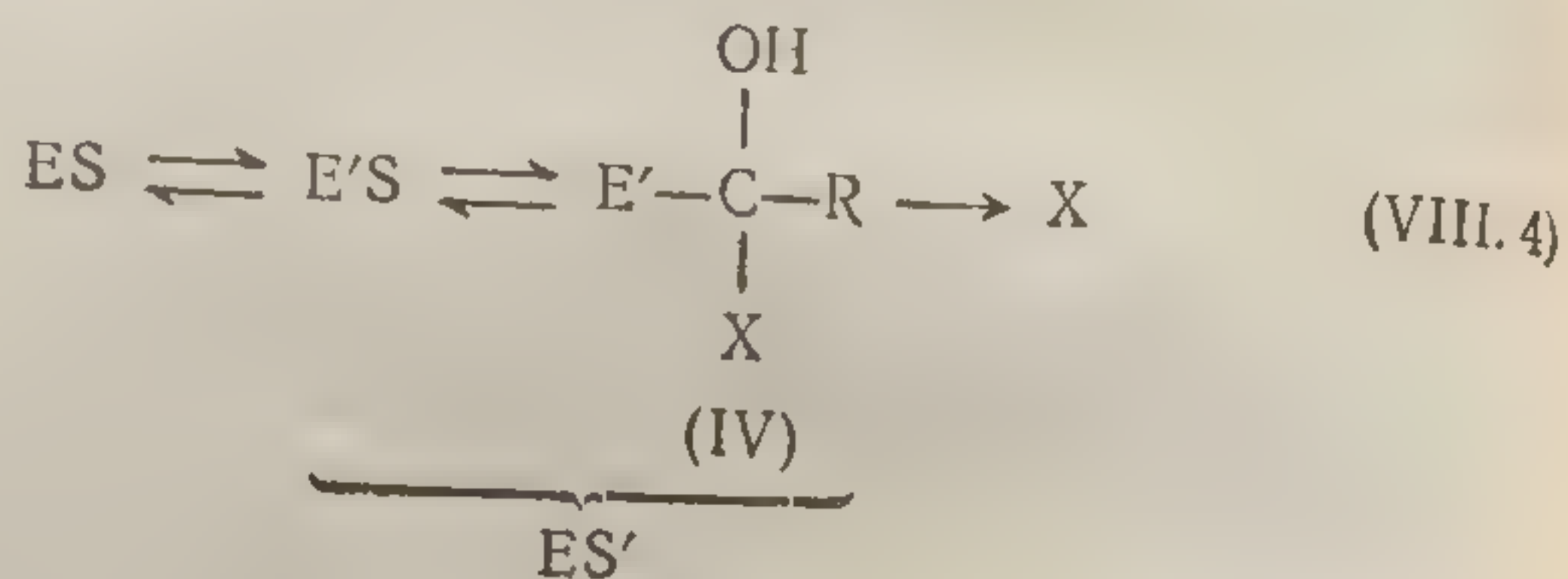
Фиг. 98. Освобождение этанола при гидролизе этилового эфира бензонил-L-аргинина (T. E. Barman and H. Gutfreund, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 53, 1245, 1965).

Длинная черточка на оси ординат соответствует завершению реакции на 50%.

во-первых, характер зависимости скорости реакции (измеряемой одним из рассмотренных выше индикаторных методов) от концентрации фермента и субстрата и, во-вторых, тот факт, что скорость освобождения P<sub>1</sub> (фиг. 97) может быть существенно меньшей, чем наибольшая скорость, фиксируемая методами с применением хромофорных индикаторов. Нельзя также исключить возможность того, что постулируемое второе



промежуточное соединение ( $ES'$ ) в действительности включает ряд промежуточных соединений



Приведен (VIII.3) лишь наиболее простой механизм, согласующийся с полученными экспериментальными данными. Высказано два предположения относительно молекулярного строения этого второго промежуточного соединения. Первое, достаточно обоснованное исходит из того, что переход  $ES \rightarrow ES'$  является конформационным изменением фермента (точнее, что имеет место переход  $ES \rightarrow E'S$ ). В пользу этого предположения говорит наблюдаемое в начальной фазе реакции изменение спектральных характеристик, обусловленных тирозиновыми и триптофановыми хромофорами белка. Второе предположение исходит из образования химического промежуточного соединения, в котором еще сохранены все связи, имевшиеся в исходном субстрате (отщепление  $P_1$  необратимо, тогда как переход  $ES \rightleftharpoons ES'$ , как показывают экспериментальные данные, должен быть обратимым). Правдоподобным представляется образование промежуточного тетраэдрического соединения типа IV [уравнение (VIII.4)]. Любопытно сопоставить две рассмотренные альтернативы, ибо они отражают идеи, имеющие хождение в современной энзимологии. В основе первой лежит представление о динамической роли фермента при осуществлении катализа, тогда как вторая основывается на аналогиях с ранее изученными механизмами реакций, в которых участвуют органические соединения, и предусматривает стереохимически инвариантные, комплементарные взаимоотношения между ферментом и субстратом на протяжении всей каталитической реакции. В отличие от трипсина и химо-

трипсина бактер...  
дисульфидных...  
мерная структур...  
ваться исключител...  
цепочечных водор...  
совых и кулоново...  
также содержит...  
остаток серина; о...  
по соседству с э...  
от таковой у трип...

Тр...  
Асп-Сер...

Поскольку в моле...  
ционнспособного...  
кислоты, существ...  
ском акте у дру...  
сина — берется п...

Показано, что...  
(трипсина, химо...  
тилизинов), суш...  
молекуле котор...  
гичной уникальн...  
функцией этих...  
производных ка...  
природных сло...  
линэстераза, печ...  
крови функцион...  
ханизму, что и...  
ферменты. С эф...  
своим свойствам...  
что ферменты с...  
ком серина кат...  
форной кислоты...  
переноса фосфат...  
фофруктокиназа...  
рильной группе...  
протеолитически...  
показано, что



трипсина бактериальные субтилизины не содержат дисульфидных связей (фиг. 93). Следовательно, трехмерная структура этих ферментов должна поддерживаться исключительно за счет специфических внутрицепочечных водородных связей, а также вандерваальсовых и кулоновских сил. В молекуле этих ферментов также содержится уникальный реакционноспособный остаток серина; однако последовательность аминокислот по соседству с этим остатком значительно отличается от таковой у трипсина и химотрипсина:

Тре-Сер\*-Мет-Ала (субтилизин),

(VIII. 5)

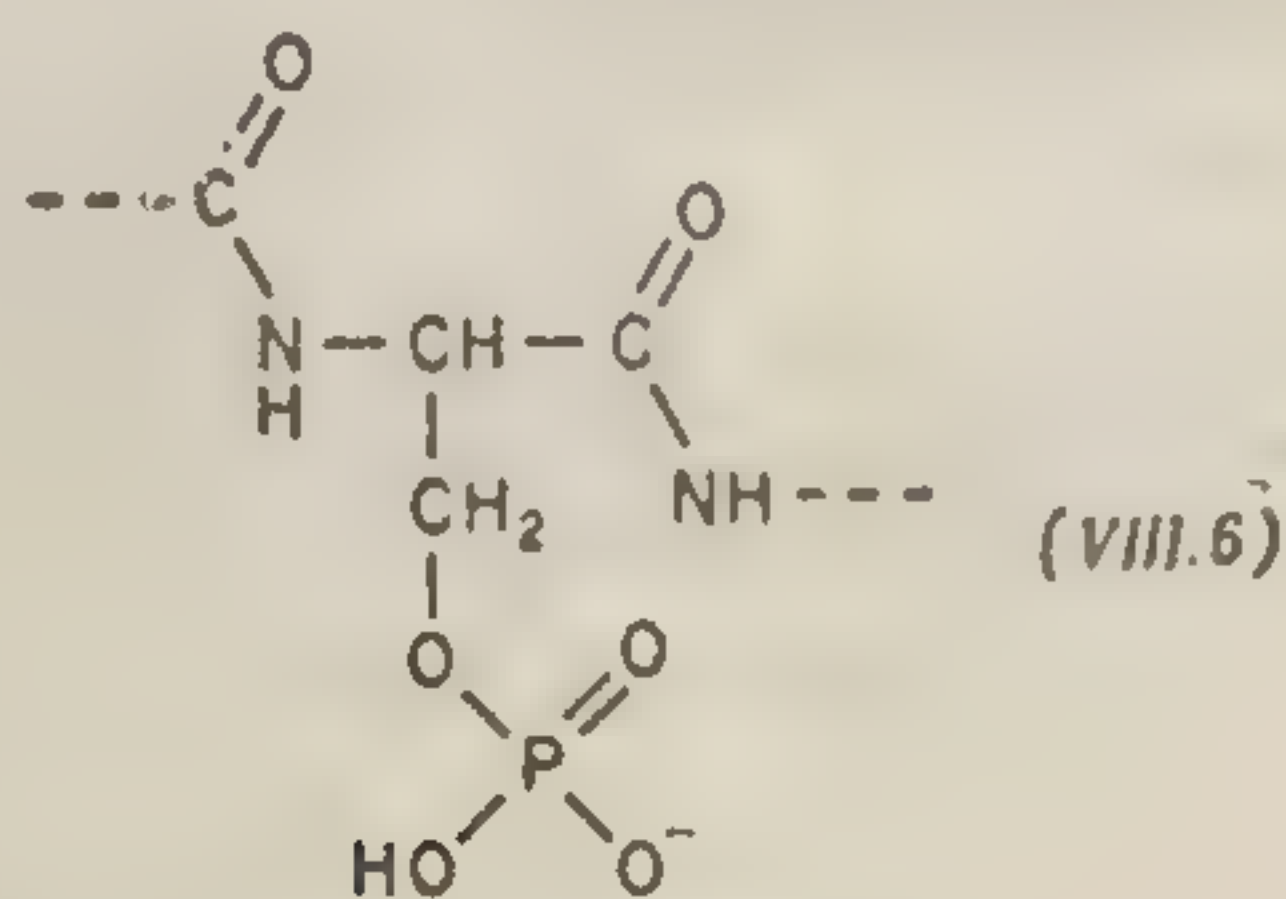
Асп-Сер\*-Гли-Гли (трипсин и химотрипсин).

Поскольку в молекуле субтилизина около остатка реакционноспособного серина нет остатка аспарагиновой кислоты, существенная роль последнего в каталитическом акте у других протеиназ — у химотрипсина и трипсина — берется под сомнение.

Показано, что, помимо протеолитических ферментов (трипсина, химотрипсина, тромбина, эластазы и субтилизинов), существует еще одна группа ферментов, в молекуле которых содержится остаток серина с аналогичной уникальной реакционноспособностью. Основной функцией этих ферментов, катализирующих гидролиз производных карбоновых кислот, является расщепление природных сложных эфиров. По-видимому, ацетилхолинэстераза, печеночные эстеразы и эстеразы сыворотки крови функционируют по тому же каталитическому механизму, что и рассмотренные выше протеолитические ферменты. С эфирами карбоновых кислот сходны по своим свойствам эфиры фосфорной кислоты. Известно, что ферменты с уникально реакционноспособным остатком серина катализируют как гидролиз эфиров фосфорной кислоты (щелочная фосфатаза), так и реакции переноса фосфатного остатка (фосфоглюкомутаза, фосфофруктокиназа). Отношение этих ферментов к фосфорильной группе в известной мере аналогично отношению протеолитических ферментов к ацильной группе. Было показано, что при реакции щелочной фосфатазы с

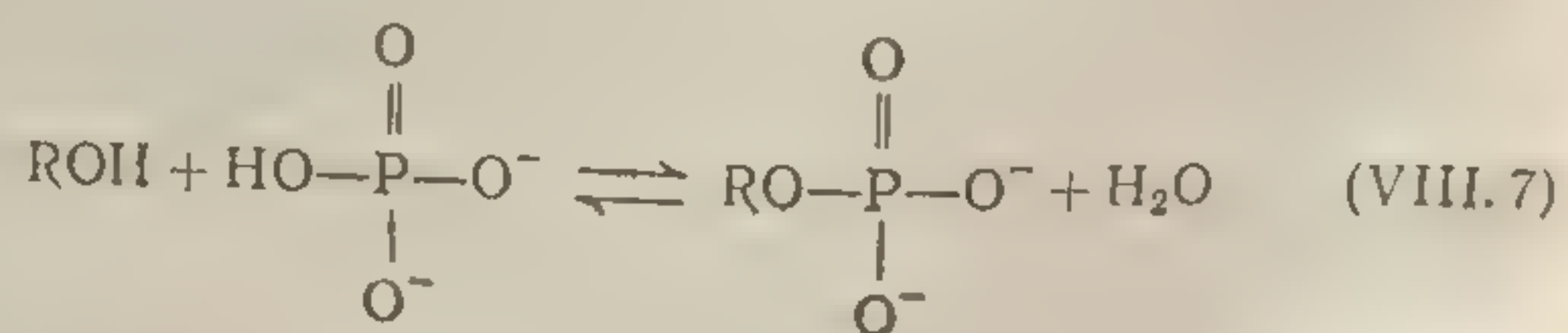


субстратом образуется промежуточное соединение, имеющее следующее строение:



Фосфосериновый пептид

С применением  $\text{P}^{32}$ -фосфоэфирных субстратов или свободного  $\text{P}^{32}$ -фосфата были получены фосфорные эфиры по активному сериновому остатку щелочной фосфатазы, а затем (после фрагментации фермента) определена последовательность аминокислот вблизи этого остатка. То обстоятельство, что из свободного фосфата и фермента образуется при нейтральном pH значительное количество фосфосеринового эфира



является в известной мере неожиданным в свете данных о величине свободной энергии гидролиза фосфорных эфиров в нейтральной водной среде.

Активный фосфосериновый эфир, образуемый ферментом, термодинамически более стабилен, чем обычные фосфорные эфиры (включая фосфорные эфиры обычных сериновых пептидов). В то же время в нейтральном водном растворе он оказывается значительно более реакционноспособным, чем термодинамически менее стойкие обычные фосфосериновые эфиры.

Связь между активностью нуклеазы. Целостная структура (гипотетической) в большом числе экзификации аминокислот в каталитическом активном центре что в каталитическом остатке (не помещается). При установлении функции рибонуклеазы, что в каталитическом ферменте по расщеплению остатков. Два остатка делены хроматографом. После удаления пептидов поразительными. При отсутствии мочевины (валентная) рекомбинацией рибонуклеазы не только свидетельствует о взаимодействии полипептидной цепи возможности для специфического разложения аминокислотных полипептидных цепей. Влияние разложения на каталитическую активность. При обработке удаляется избирательно два остатка гистидина, что каждый из них "ти". Следующий.



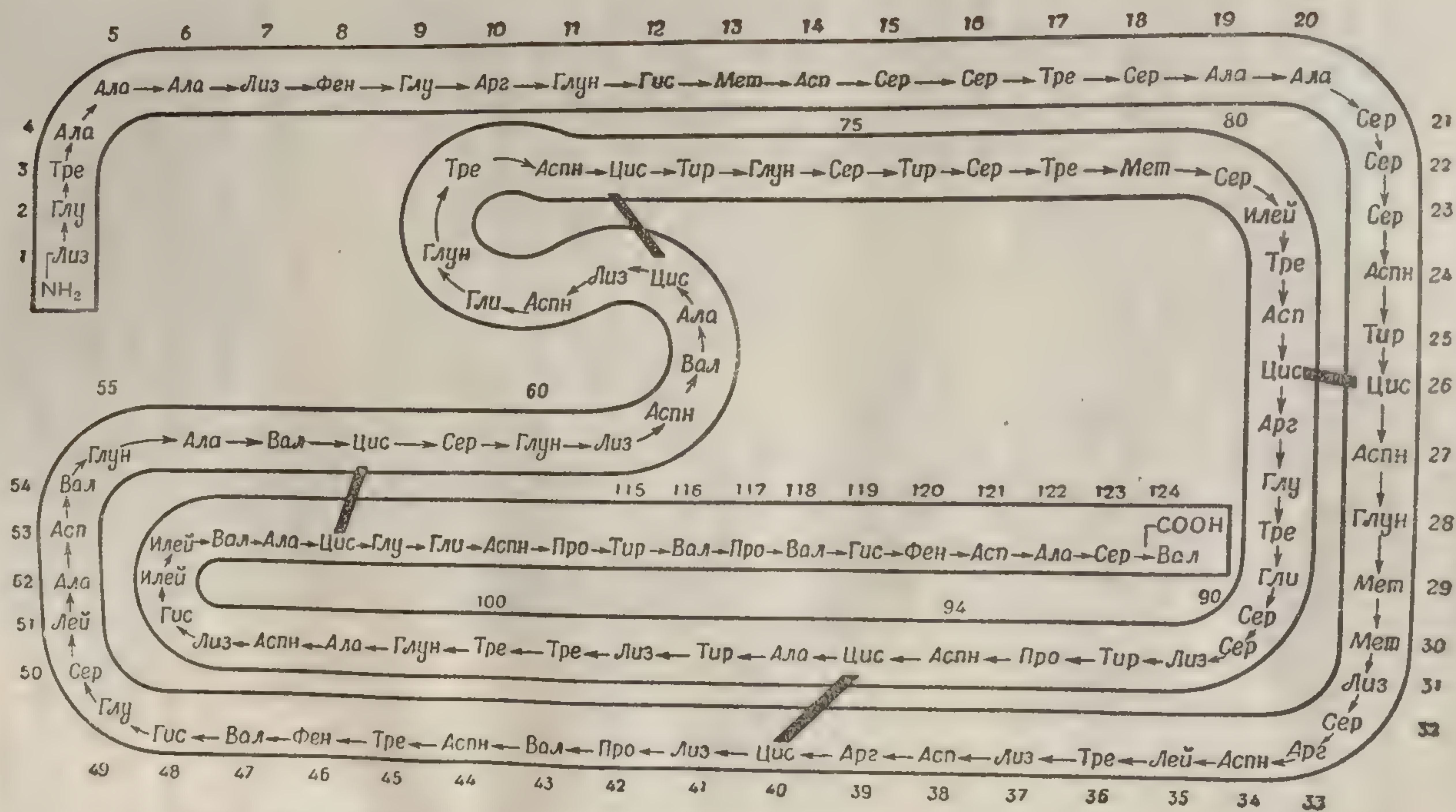
## 2. РИБОНУКЛЕАЗА

Связь между первичной структурой фермента и его активностью наиболее детально исследована в случае рибонуклеазы. Целесообразно начать обсуждение с первичной структуры этого фермента, которая схематически представлена на фиг. 99. Причудливая форма этой (гипотетической) двумерной структуры основана на большом числе экспериментальных данных по идентификации аминокислотных остатков, участвующих в каталитическом акте или же локализованных вблизи активного центра (фиг. 100); не исключено, конечно, что в каталитическом механизме участвуют и другие остатки (не помеченные на схеме).

При установлении взаимосвязи между структурой и функцией рибонуклеазы важную роль сыграло то обстоятельство, что с помощью бактериального протеолитического фермента субтилизина удается избирательно расщепить полипептидную цепь между 20-м и 21-м остатками. Два образующихся пептида могут быть разделены хроматографией в денатурирующем растворе. После удаления денатурирующего агента выделенные пептиды порознь оказываются каталитически неактивными. При совместном же их инкубировании в отсутствие мочевины происходит специфическая (нековалентная) рекомбинация с практически полным восстановлением рибонуклеазной активности. Эти данные не только свидетельствуют о наличии комплементарных взаимодействий между соответствующими участками полипептидной цепи фермента, но и открывают возможности для специфического химического модифицирования аминокислотных остатков в каждой из двух полипептидных цепей в отдельности, что позволяет определить влияние подобного локализованного модифицирования на каталитическую активность реконструированного активного фермента.

При обработке нативной рибонуклеазы иодацетатом удается избирательно и независимо модифицировать два остатка гистидина — 12 или 119. Было показано, что каждый из них существен для каталитической активности. Следует отметить, что эти два остатка





Ф и г. 99. Первичная структура пептидной цепи панкреатической рибонуклеазы.

находятся  
цепи. Удаля  
остатка. Ин  
они также  
они о том,  
ние о (фиг  
жены

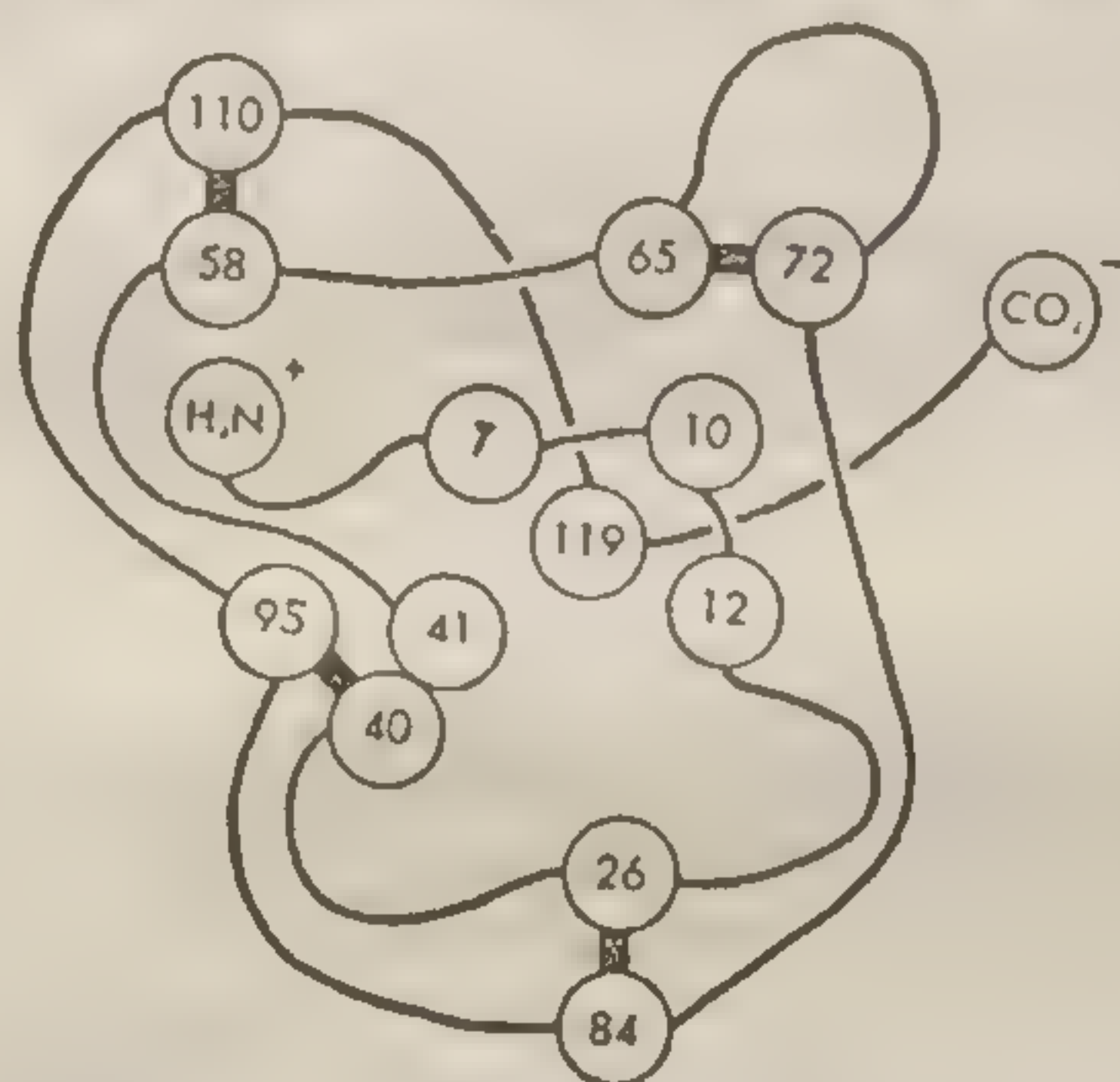
Ф и г. 100. С  
венных для

в которых  
агент 2,4  
взаимоде

образует  
группы  
водные  
концентр  
жения

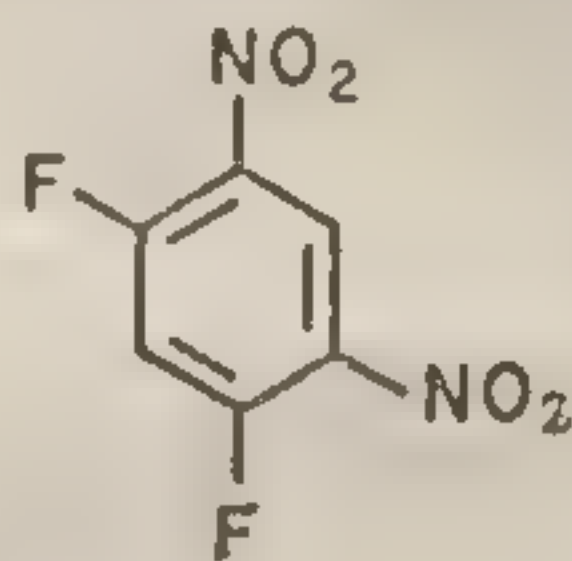


находятся у противоположных концов полипептидной цепи. Удалось также избирательно модифицировать два остатка лизина (41 и 7); при этом выяснилось, что оба они также важны для каталитического акта. Заключение о том, что в молекуле фермента эти остатки сближены (фиг. 100), эффектно подтверждается опытами,



Фиг. 100. Схема расположения боковых цепей аминокислот, существенных для каталитической функции, в молекуле рибонуклеазы (показаны также дисульфидные связи).

в которых было установлено, что бифункциональный реагент 2,4-динитро-1,5-дифторбензол (V), специфически взаимодействующий с аминогруппами,



(V)

образует химический мостик, связывающий ε-аминогруппы лизиновых остатков 41 и 7. Полученное производное оказалось каталитически инертным. Фосфат в концентрациях, достаточных для конкурентного торможения активности рибонуклеазы, очень эффективно

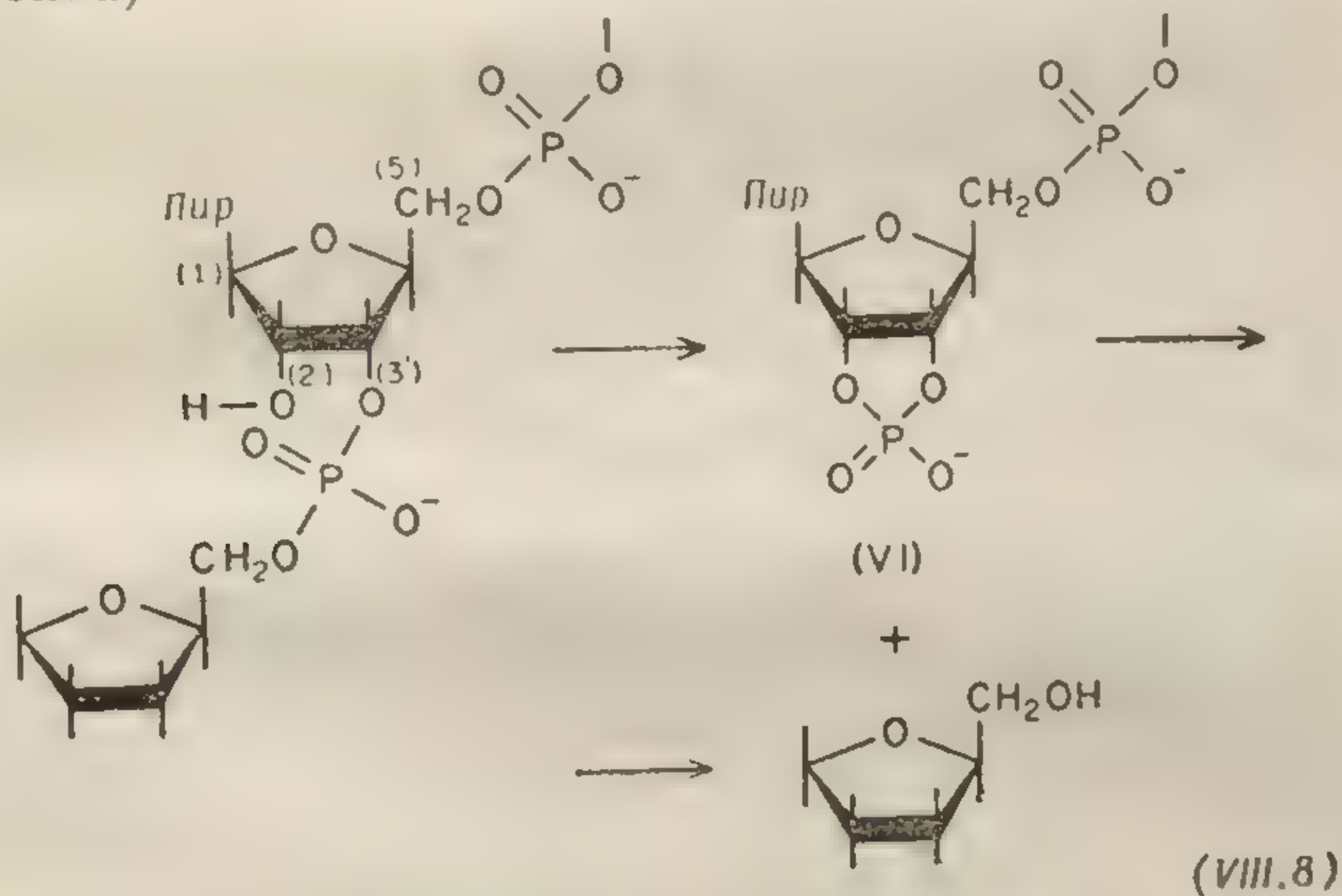






необходимая для образования активного центра, представляет собой термодинамически наиболее стабильную конформацию. Эти данные указывают на высокую степень комплементарности при взаимодействии между различными участками полипептидной цепи в молекуле рибонуклеазы.

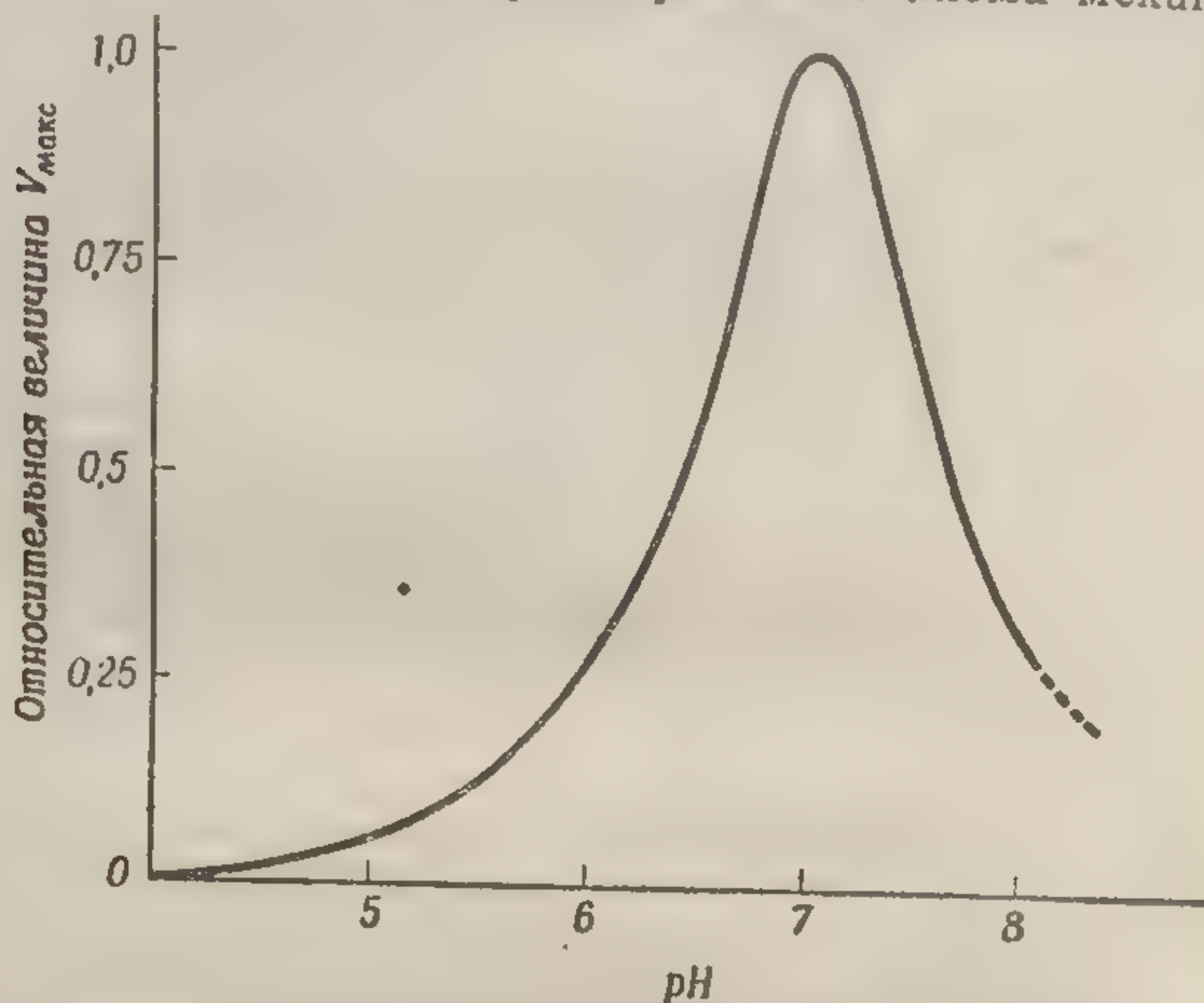
Ключом к выяснению механизма действия рибонуклеазы послужило обнаружение среди продуктов гидролиза рибонуклеиновой кислоты 2',3'-циклических фосфатов (VI). Было установлено, что 2',3'-циклические нуклеозидфосфаты могут служить субстратами рибонуклеазы. Уравнение (VIII.8) поясняет путь ферментативного превращения рибонуклеиновой кислоты (Пир означает здесь остаток пиримидина — урацила или цитозина).



Скорость гидролиза синтетических нуклеотидных субстратов и рибонуклеиновой кислоты как функция рН показана на фиг. 101. Колоколообразная форма кривой говорит в пользу синхронного механизма общего кислотно-основного катализа; значения  $pK_a$  позволяют считать, что в процессе участвует два остатка гистидина, из которых один функционирует как кислота, а другой — как основание. Это заключение согласуется с результатами рассмотренных выше опытов по



модифицированию, которые также свидетельствуют о существенном значении двух остатков гистидина для каталитической активности рибонуклеазы. Схема механизма



Фиг. 101. Зависимость  $V_{\max}$  от pH для катализируемой рибонуклеазой реакции гидролиза циклического нуклеозид-2',3'-фосфата.

действия рибонуклеазы, основанная на синхронном кислотно-основном катализе, приведена на фиг. 102. Следует обратить внимание на то, что имидазольные остатки в двух сходных последовательных стадиях приведенного механизма меняются ролями.

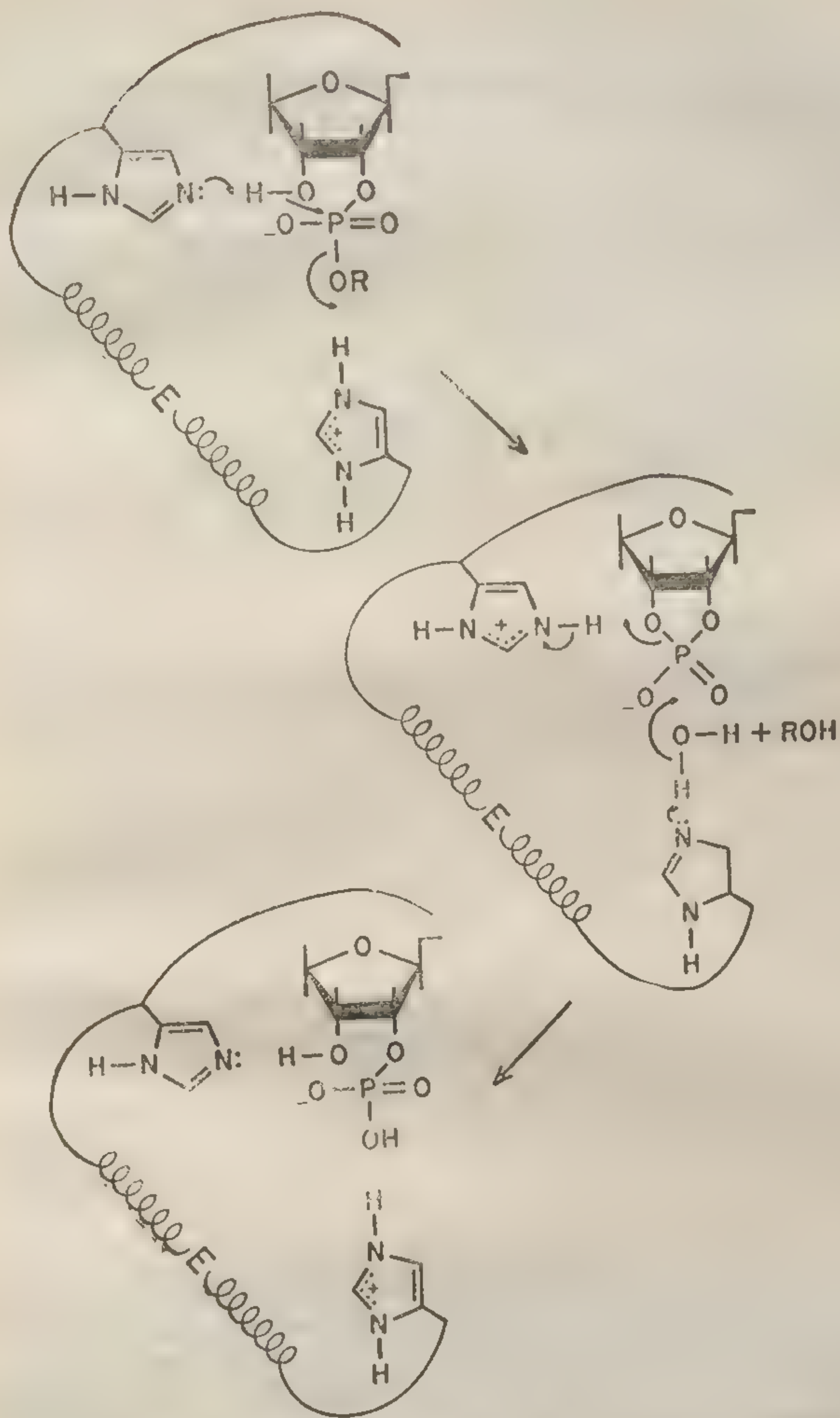
### 3. ФЕРМЕНТЫ, НУЖДАЮЩИЕСЯ В ПИРИДОКСАЛЬФОСФАТЕ<sup>1</sup>

Многие ферменты, участвующие в обмене аминокислот, содержат прочно связанный пиридоксальфосфат.

<sup>1</sup> Более точную трактовку взаимозависимости между строением и спектральными свойствами соединений пиридоксальфосфата с апоферментами и субстратами, а также изложение современных представлений о детальном механизме ферментативного переаминирования и других реакций, катализируемых пиридоксальными ферментами, см. в литературных источниках, цитированных в конце главы. — Прим. ред.

Фиг. 102. Предположительная схема механизма гидролиза нуклеозид-2',3'-фосфата двумя имидазольными остатками гистидина.

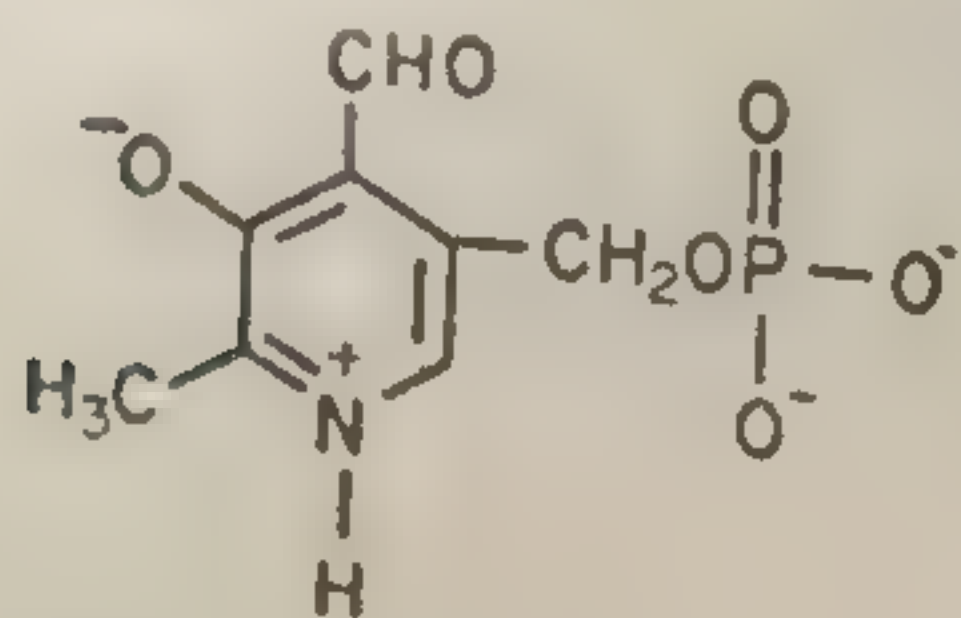




Ф и г. 102. Предполагаемый механизм катализируемого рибонуклеазой гидролиза циклического нуклеозид-2',3'-фосфата с участием двух имидазольных групп, согласующийся с экспериментальными данными, приведенными на фиг. 101.

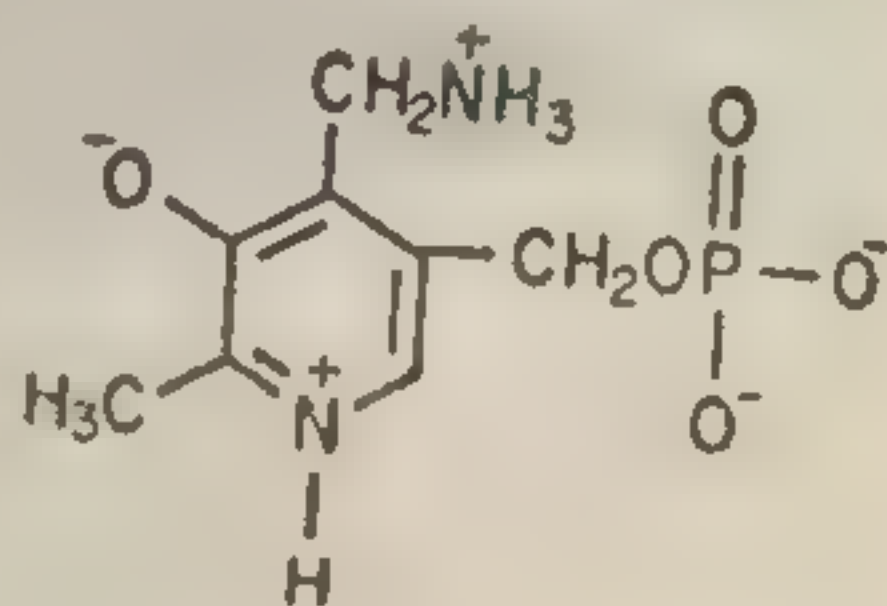


Во всех исследованных до настоящего времени случаях было установлено, что пиридоксальфосфат присоединен



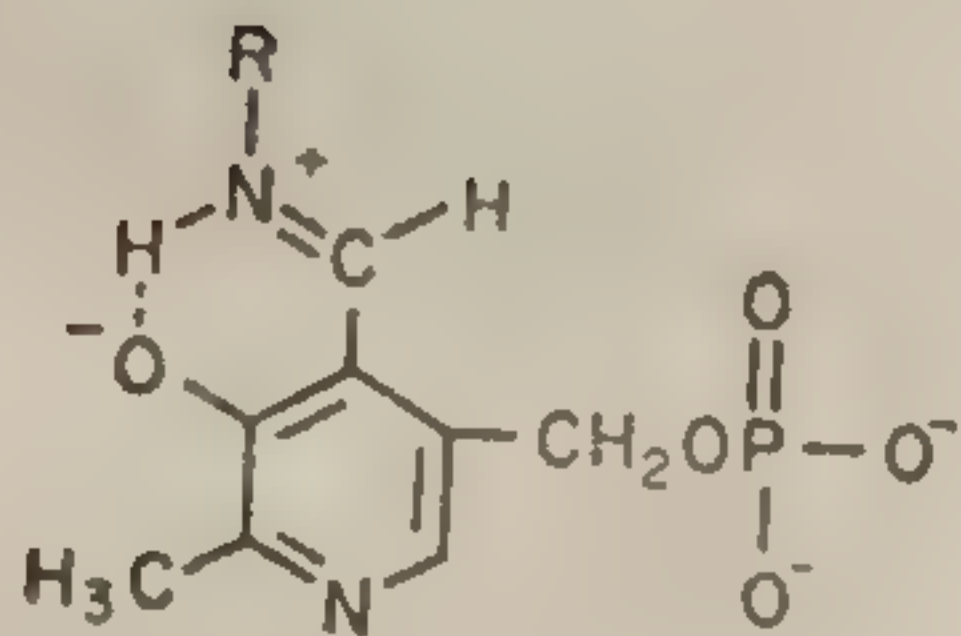
VII

Пиридоксальфосфат  
( $\lambda_{\text{макс}} = 388 \text{ мк}$ )



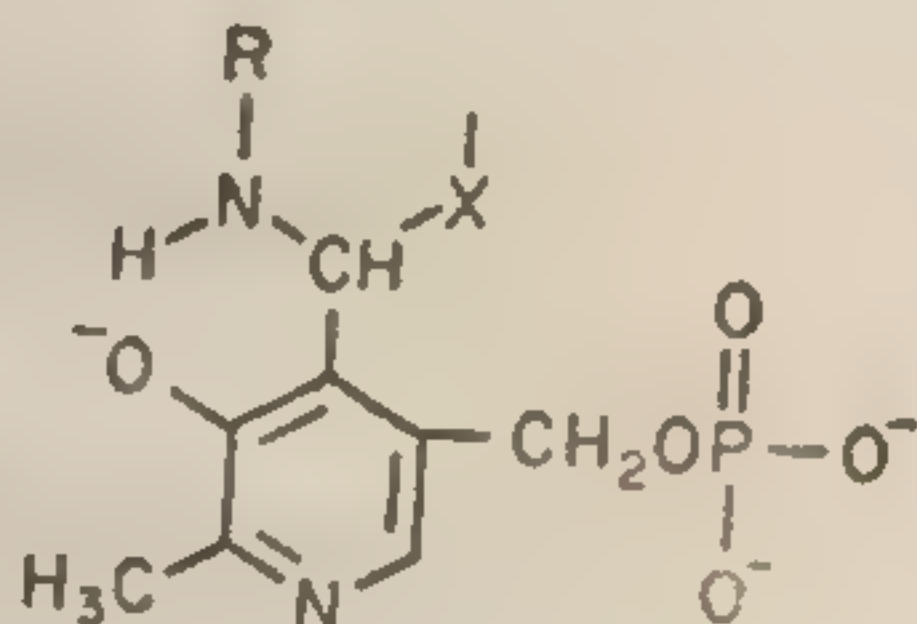
VIII

Пиридоксаминфосфат  
( $\lambda_{\text{макс}} = 325 \text{ мк}$ )



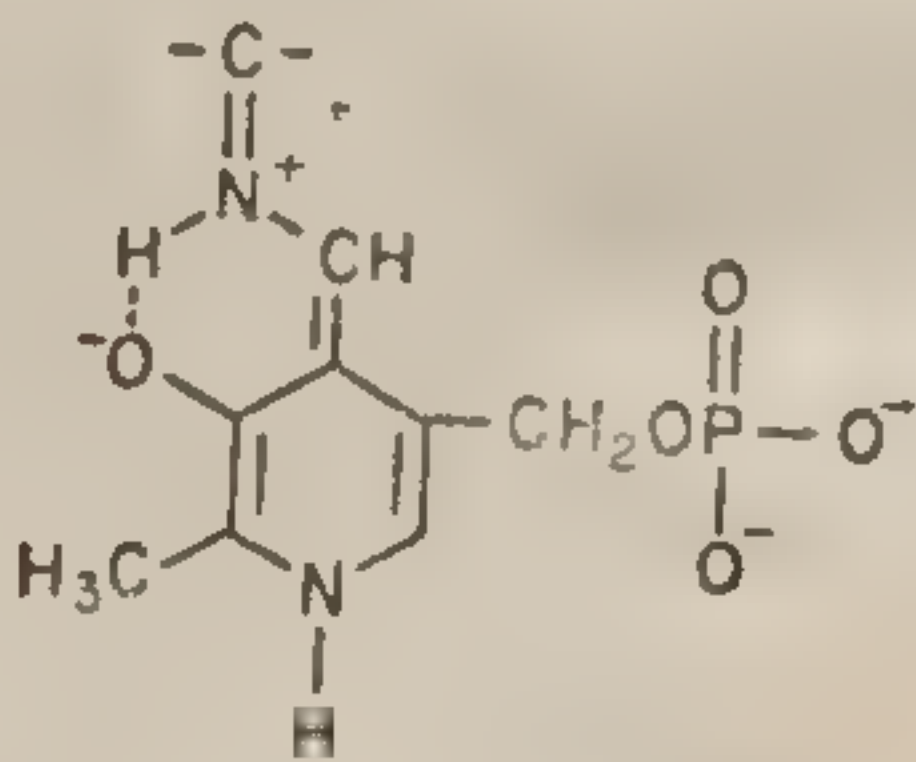
IX

( $\lambda_{\text{макс}} = 400-430 \text{ мк}$ )



X

( $\lambda_{\text{макс}} = 325-335 \text{ мк}$ )



XI

( $\lambda_{\text{макс}} = 500 \text{ мк}$ )

Фиг. 103. Молекулярная структура и максимумы поглощения различных производных пиридоксала, играющих установленную (VII—IX) или предположительную роль в реакциях, катализируемых фосфопиридоксальными ферментами.

к белковой части фермента через ковалентную связь с определенным лизиновым остатком. Заключение о характере этой связи можно сделать, исходя из того, что

при элюации  
нами образуются  
Спектры разл  
сальевых соеди  
различными в  
ного белка и  
максимумы по  
его производн  
Указанные  
XI) имеют пря  
вания, которые  
ментами (см.  
тивные реакци  
дует отметить,  
входящие в с  
а также фено  
зывать и отда  
обстоятельств  
этих производ  
подчеркнуть,  
не для всех а  
речисленных  
Установле  
фосфата с ал  
определенного  
реакции альд  
должно обра  
это происход  
аминами. Пр  
мент-пиридок  
спектральные  
табл. 19 гово  
дается в ряд  
симула погл  
может объяс  
1) присоеди  
связи (как в  
кньюгирова  
томерной пер  
иминного пр  
либо к ф



при аналогичных реакциях между альдегидами и аминами образуются шиффовы основания (разд. 3 гл. VI). Спектры различных хромофорных апофермент-пиридоксальных соединений неожиданно оказались совершенно различными в зависимости от природы данного ферментного белка и от значения pH. На фиг. 103 приведены максимумы поглощения пиридоксальфосфата и ряда его производных, структура которых известна.

Указанные производные пиридоксальфосфата (VII—XI) имеют прямое отношение к реакциям трансаминирования, которые катализируются пиридоксальными ферментами (см. на фиг. 87 соответствующие неферментативные реакции, катализируемые пиридоксалем). Следует отметить, что у всех этих производных атомы азота, входящие в систему конъюгированных двойных связей, а также фенольный кислородный атом способны связывать и отдавать протон. Именно этим объясняется то обстоятельство, что характер спектров поглощения всех этих производных зависит от pH. Необходимо, однако, подчеркнуть, что зависимость спектра от pH характерна не для всех апофермент-пиридоксальных соединений перечисленных в табл. 19.

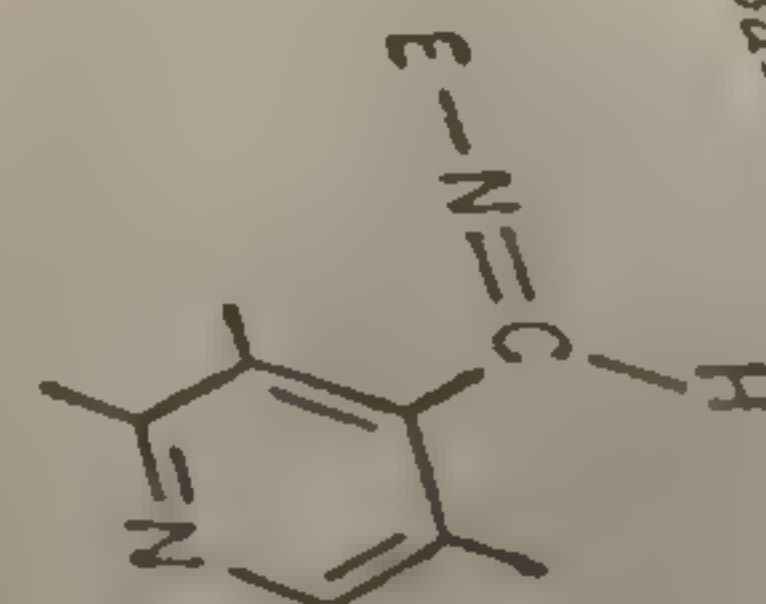
Установлено, что прочное связывание пиридоксальфосфата с апоферментом происходит по ε-аминогруппе определенного лизинового остатка (гл. V). В результате реакции альдегида с первичной аминогруппой (лизина) должно образовываться шиффово основание (IX), как это происходит в модельных реакциях пиридоксала с аминами. При умеренно кислых значениях pH апофермент-пиридоксальное соединение должно иметь те же спектральные свойства, что и соединение IX. Данные табл. 19 говорят о том, что это действительно наблюдается в ряде случаев, но далеко не всегда. Сдвиг максимума поглощения в более коротковолновую область может объясняться различными причинами, например: 1) присоединением нуклеофила к иминной двойной связи (как в соединении X); 2) деформацией планарной конъюгированной структуры соединения IX или 3) таутомерной перегруппировкой, связанной с перемещением иминного протона либо к азоту пиридинового кольца, либо к фенольному атому кислорода. Различный



Спектральные характеристики трансаминаз и производных пиридоксала

Трансаминаза (катализируемая реакция) или производное пиридоксала	Источник	pH	$\lambda_{\text{макс}}$ мик	pK
Глутамат — аспартат	Сердце свиньи (надосадочная фракция экстракта)	4,6 8,4	430 362	6,3
Глутамат — аспартат	Печень быка (надосадочная фракция)	5,0 9,0	430 362	6,2
Глутамат — аспартат	Печень быка (митохондрии)	5,0 9,0	435 355	6,2
Глутамат — аланин	Сердце голубя (надосадочная фракция)	4,5 8,5	426 Несколько пиков в области 330—450	7,3
Лейцин — изолейцин	Сердце голубя (надосадочная фракция)	4,8—10,5	414, 326	—
Трансаминаза D-аминокислот	<i>Bacillus subtilis</i>	5—9	330, 415	—
Пиридоксамин — пируват	<i>Pseudomonas</i> sp.	—	415	(связанный пиридоксаль)
Аспартат- $\beta$ -декарбоксилаза <sup>1)</sup>	<i>Achromobacter</i> sp., <i>Clostridia</i> sp.	3—8	360	—
Серин-трансоксиметилаза <sup>1)</sup>	Печень кролика	5—9,7	430	—
Пиридоксальфосфат	—	7	388, 330	—
Пиридоксаль	—	7	318, 390	—
Пиридоксаль-валин (имин)	—	7 12	324, 425 361	10,9

<sup>1)</sup> Как аспартат- $\beta$ -декарбоксилаза, так и серин-трансоксиметилаза медленно реагируют с рядом аминокислот, образуя соответствующие кетоокислоты.

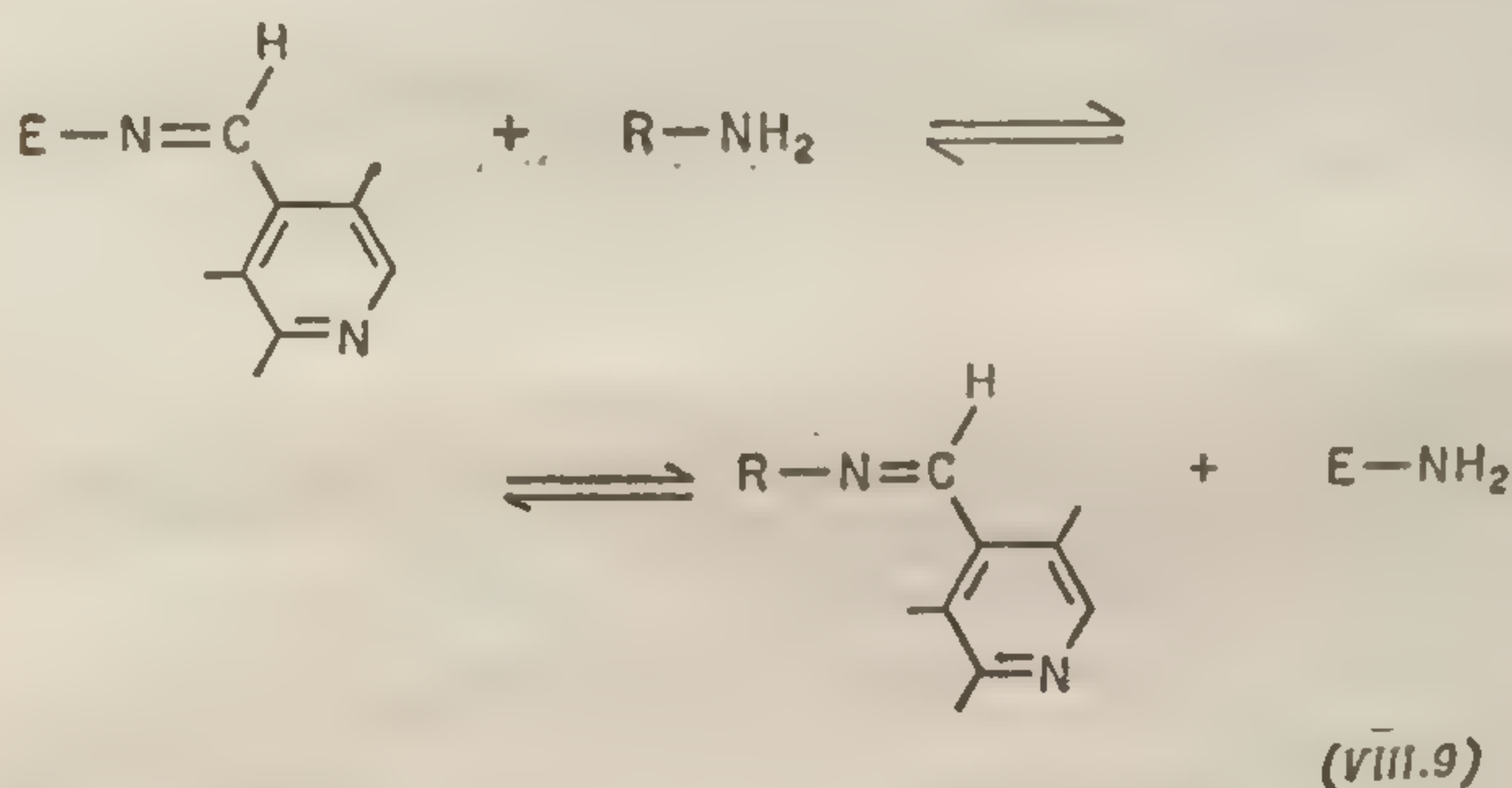


характер наблюдений, что окисление, связанная с окислением, боковое и тонкую, как на свойстве, фермент-пиридокс, по типу «амин-пропановый».

При добавлении ожидать лишь апофермент-пиридокс кофермент же под действием только пиридокс, прочно связывающийся, однако, в транзакционные характерные. Одним из добавлений с мер, аминокислоты пиридоксальфосфат, поглощения, ствие субстрата, нений подобно. Это обусловлено C—N-связью функциональной



характер наблюдаемых спектров является указанием на то, что окружение, в котором находится химически связанная с белком простетическая группа, оказывает глубокое и специфическое для данного фермента влияние как на тонкую химическую структуру, так и на каталитические свойства кофермента. Реакция аминов с апофермент-пиридоксальфосфатным соединением протекает по типу «амин-иминного обмена», или трансальдиминирования:



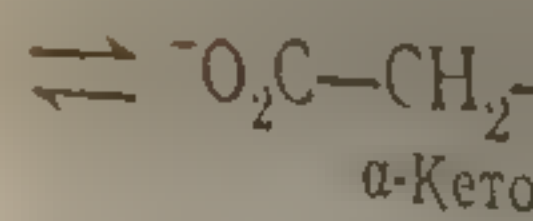
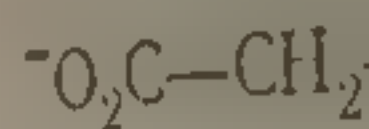
При добавлении субстратов (аминов) можно было бы ожидать лишь незначительных изменений в спектрах апофермент-пиридоксальных соединений, особенно если кофермент жестко фиксирован на поверхности белка под действием физических сил (установлено, что не только пиридоксальфосфат, но и пиридоксаминфосфат прочно связывается с апоферментом). В действительности, однако, при добавлении аминных субстратов спектральные характеристики изменяются весьма существенно. Одним из таких изменений, которое наблюдается при добавлении определенных аминных субстратов (например, аминокислот), а также в ходе неферментативного пиридоксалевого катализа, является появление полосы поглощения, характерной для соединения XI. В отсутствие субстратов у апофермент-пиридоксальных соединений подобные спектры не обнаруживаются (табл. 19). Это обусловлено, по-видимому, трудностью разрыва C—H-связи без («электронного») содействия других функциональных групп, находящихся вблизи этой связи.



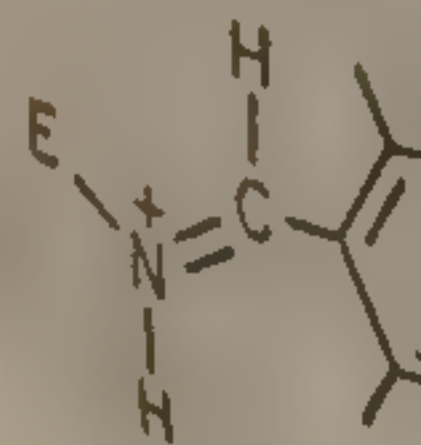
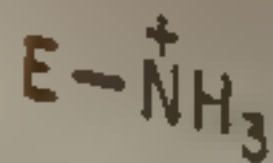
Такого рода содействие отсутствует у лизил-ε-имино-шиффового основания (IX). При образовании альдиминового производного) лабильность C—N-связи повышается из-за близости карбоксильной группы, результатом чего может быть таутомеризация с образованием кетимина (XI). Следует обратить внимание на то, что молекула воды, присоединяясь к соединению XI, может атаковать любую из двух двойных связей, находящихся вне кольца (фиг. 87). Гидратация по связи N—C субстрата приводит в конечном счете к образованию кетокислоты и пиридоксаминфосфата, тогда как гидратация по другой связи, N—C кофермента, приводит к регенерации пиридоксальфосфата и исходной аминокислоты. В том случае, когда субстратом является аминокислота, последовательность реакций при образовании соединения XI включает удаление атома водорода от α-углерода; поэтому параллельно с гидратацией может происходить рацемизация. Действительно, известны специфичные, содержащие пиридоксальфосфат ферменты, катализирующие либо реакцию рацемизации, либо специфическое взаимопревращение L- и D-аминокислот. Если реакция протекает в направлении образования кетокислоты и пиридоксаминфосфата, то спектральные характеристики в состоянии равновесия зависят от величины константы равновесия для реакции гидратация — дегидратация (XI → VIII). Известны аналоги аминокислот с особо лабильными α-C—N-связями (например, β-окси-аспартат), для которых равновесие значительно смещено в направлении образования дегидратированной кетиминной структуры (XI). Подобные соединения являются эффективными ингибиторами активности фермента; они были использованы для получения спектральных характеристик кетимина.

Пиридоксальные ферменты — почти идеальные объекты для детального изучения промежуточных стадий ферментативного катализа. Индикатором происходящих в ходе катализа химических изменений служит конъюгированная пиридиновая система, обладающая сильными хромофорными свойствами. Идентификации промежуточных соединений могут помочь также «рН-индикатор-

и... соедине  
тройных ком  
страт). Еще  
ферментов я  
катализируе  
возможность  
ное распреде  
(а следогате  
единений). На  
вать положени  
оксальными ф  
Механизм дейс  
амат — аспарт  
Глутамат —  
следующую об



Реакция каждо  
из двух стади

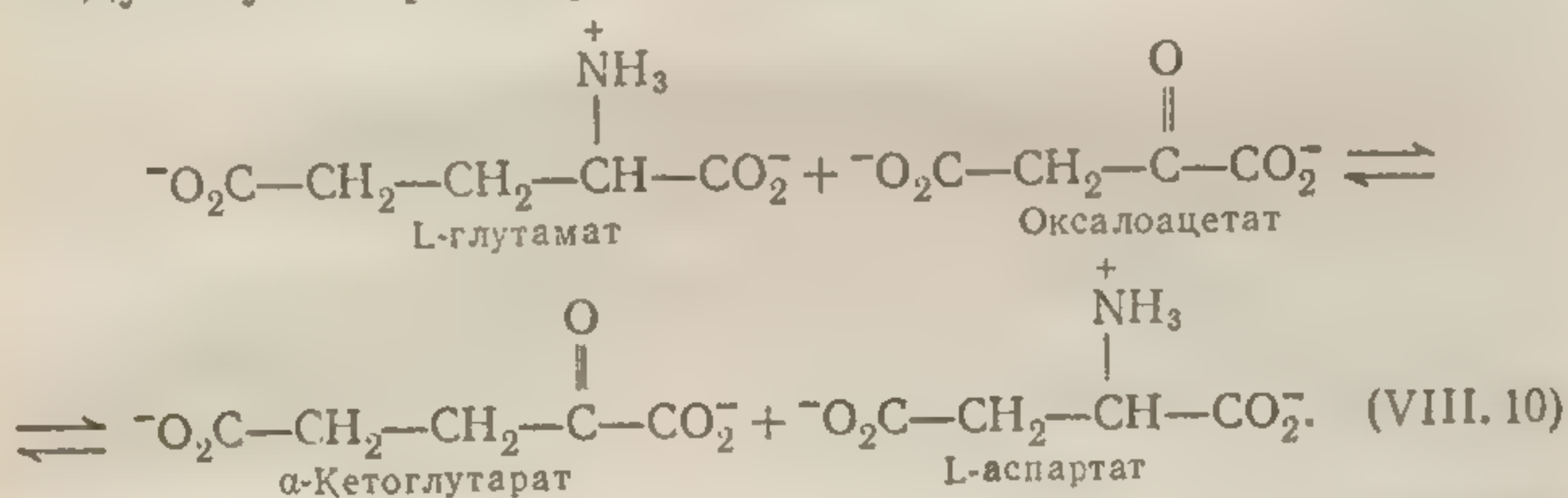


4

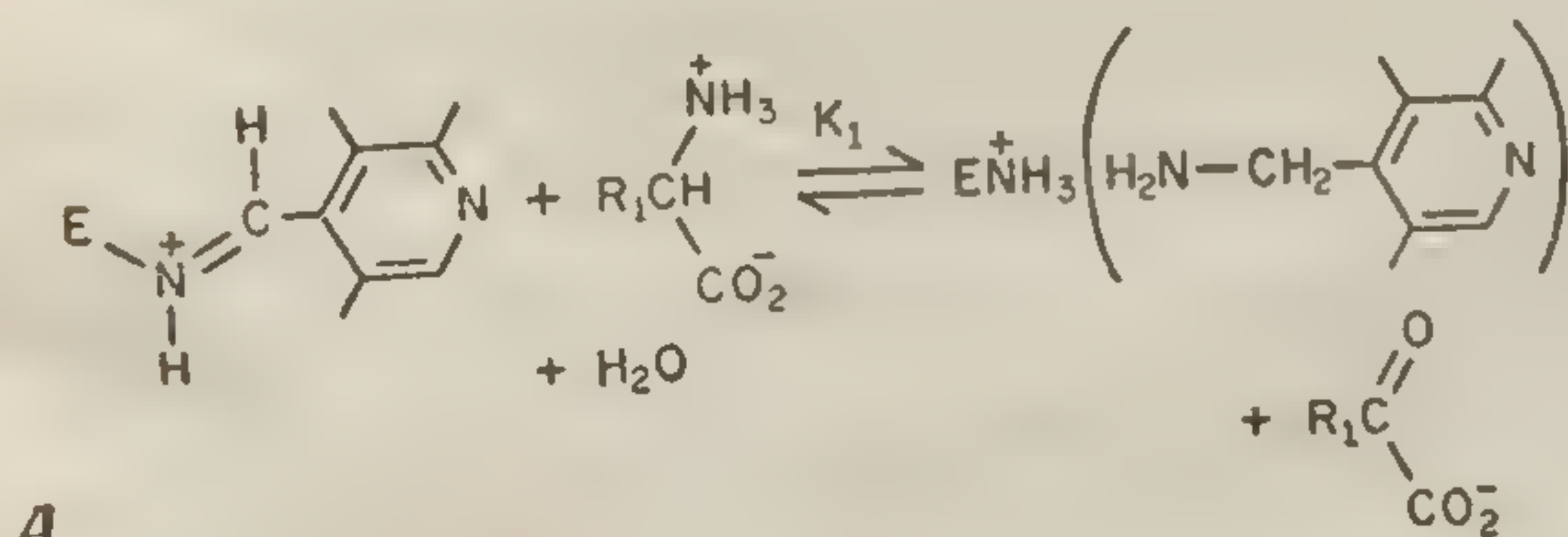
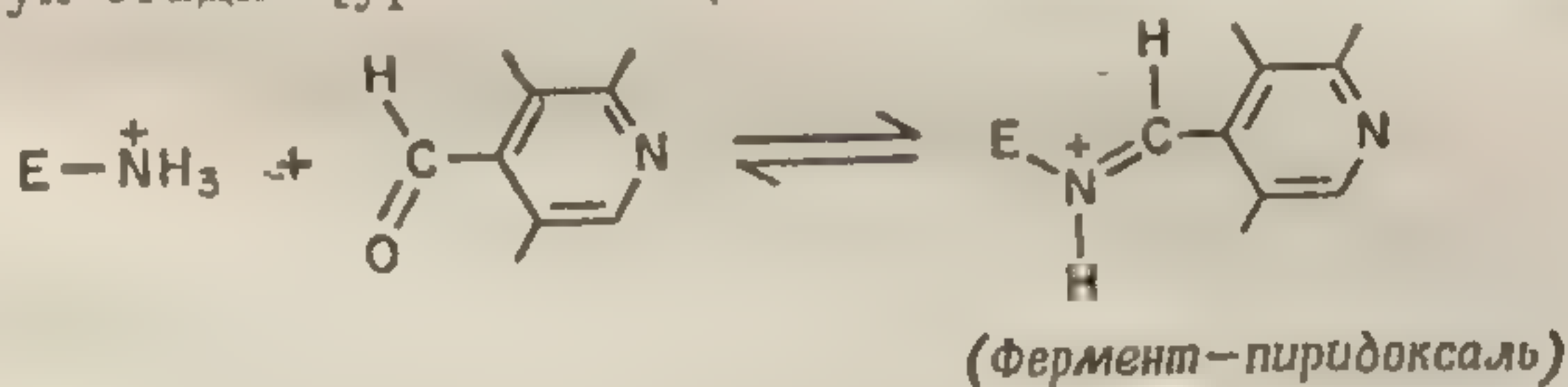


ные» свойства апофермент-коферментных комплексов и тройных комплексов (апофермент — кофермент — субстрат). Еще одним преимуществом пиридоксальных ферментов является то обстоятельство, что многие катализируемые ими реакции легко обратимы; это дает возможность изменять в широком диапазоне равновесное распределение исходных веществ и продуктов (а следовательно, и концентрацию промежуточных соединений). Наиболее эффективно удается контролировать положение равновесия при катализируемых пиридоксальными ферментами реакциях трансминирования. Механизм действия одной из трансаминаз, а именно глутамат — аспартат-трансаминазы, исследован детально.

Глутамат — аспартат-трансаминаза катализирует следующую обратимую реакцию:



Реакция каждого из субстратов с коферментом состоит из двух стадий [уравнение (VIII. 11)]:









связанные с определенными химическими структурами (фиг. 103). Быстрое изменение условий (например, изменение температуры) приводит к изменению константы равновесия реакции ( $K_{равн}$ ) [уравнение (VIII.12)]. Более того, соответственно изменяются также положения равновесия на отдельных стадиях реакции [уравнение (VIII.11)], что приводит к изменению спектральных характеристик реакционной смеси. Спектральные сдвиги, регистрируемые в ходе быстрого изменения температуры (разд. 9 гл. IV) и интерпретируемые на молекулярном уровне, могут помочь выяснить в деталях химический путь катализа, т. е. могут служить «кинетическими индикаторами» (отражающими изменение концентраций промежуточных соединений) для определения скоростей процесса на тех или иных конкретных стадиях.

Аспартат — глутамат-трансаминаза имеет широкий оптимум pH (в зоне pH 5—9). В свете ранее обсуждавшихся представлений (разд. 2 гл. VI) можно предполагать, что в контролировании скорости суммарной реакции играет роль процесс переноса протона с участием имидазольной группы остатка гистидина. Такого рода процесс должен был бы зависеть от  $pK_a$  катиона имидазолия ( $pK_a \sim 7$ ). Отсутствие на графике, описывающем зависимость скорости реакции от pH, четко выраженного pH-оптимума (как, например, в случае, приведенном на фиг. 101) или сигмоидальной pH-зависимости (как показано на фиг. 94) можно интерпретировать различным образом: 1) имидазольные группы не участвуют в процессе, контролирующем скорость; 2) процесс переноса протона, хотя и имеет существенное значение для катализа, но не является стадией, лимитирующей скорость; 3) общий кислотный и общий основной катализ, вовлекающие катион имидазолия и имидазол, осуществляются на ряде различных стадий катализа (влияющих на суммарную скорость процесса), причем в итоге наблюдается практически постоянная активность фермента в широкой зоне нейтральных значений pH. Интересно, что фотоокисление фермента с использованием в качестве фотоокислителя метиленового синего (процесс, который, как полагают, вызывает разрушение



имидазола гистидина) приводит к полной инактивации фермента.

Максимумы поглощения как у двойных комплексов [апофермент — пиридоксальфосфат (табл. 19)], так и у тройных комплексов (апофермент — пиридоксальфосфат — субстрат) лежат в более коротковолновой области, чем у шиффовых оснований (IX), но в более длинноволновой области, чем у пиридоксамина (VIII). Эти максимумы возникают, возможно, вследствие присоединения нуклеофильного остатка апофермента к шиффову основанию (как в соединении X). В качестве нуклеофильных агентов могли бы выступать свободные сульфгидрильные группы апофермента. Установлено, что при титровании определенных цистеиновых остатков аспарат — глутамат-трансаминазы ртутьсодержащими реагентами ферментативная активность утрачивается. Быстрому химическому переносу пиридоксаля между аминными группами в N<sup>ε</sup>-лизиновых и субстратных шиффовых основаниях (уравнение VIII.9) способствуют промежуточные реакции нуклеофильного присоединения.

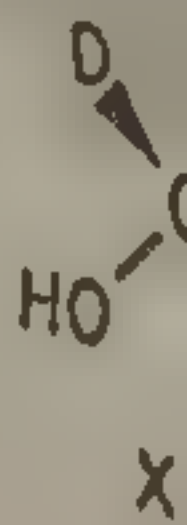
Весьма широкое значение имеет, по-видимому, такой любопытный феномен, как стабилизация структуры белка аспарат — глутамат-трансаминазы при химическом связывании кофермента (или в общем случае при химическом связывании молекулы субстрата). Сходная и весьма сильно выраженная структурная стабилизация белков, содержащих активный серин (разд. 1 данной главы), обнаружена при образовании ацилферментов (ацилированных по гидроксильной группе серина). У пиридоксальных ферментов кофермент не только выполняет ключевую роль в каталитическом процессе, но и оказывает глубокое влияние (в результате ковалентного связывания) на структуру ферментного белка. Это явление химически индуцированного структурного изменения белка (или структурной стабилизации) особенно заметно в случае фосфорилазы — фермента, который, по-видимому, не использует потенциальных каталитических функций пиридоксаля, но которому тем не менее для поддержания специфической каталитической активной конформации необходимо образование шиффова основания (фермент — (ε-амино) — пиридоксальфосфат).

4. ДЕГИДРОГЕНИЗАЦИЯ

Огромное количество реакций окисления в реакциях окисления (разд. 3 главы) страта к (окислитель) переносится один реакции они переноса к субстрату

SH<sub>2</sub>

Для каждого из процессов переноса реоспецифичность в спирта в алкогольдегидрогеназе физическое отщепление стереоспецифичность вому кольцу кофермента посредством синтетических водных этанола щепления и протекания выделяется изомерных мононовленного кофермента

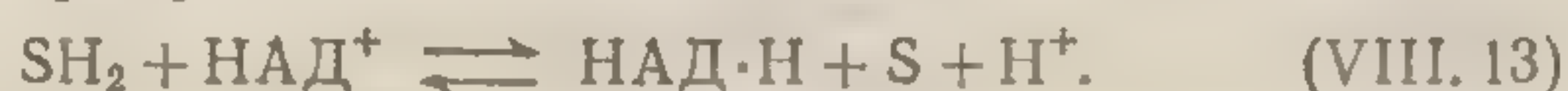


XIV

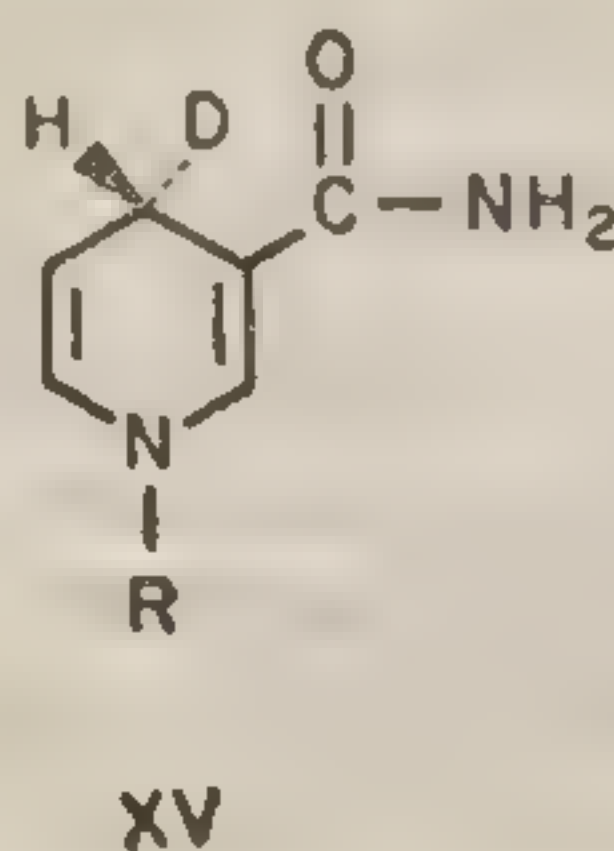
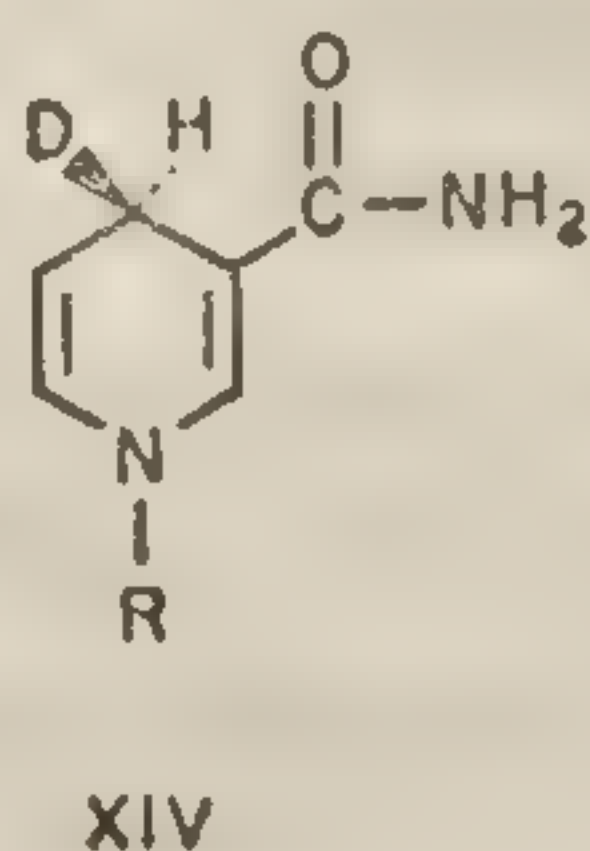
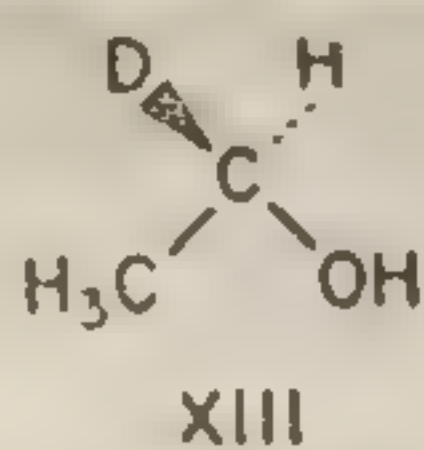
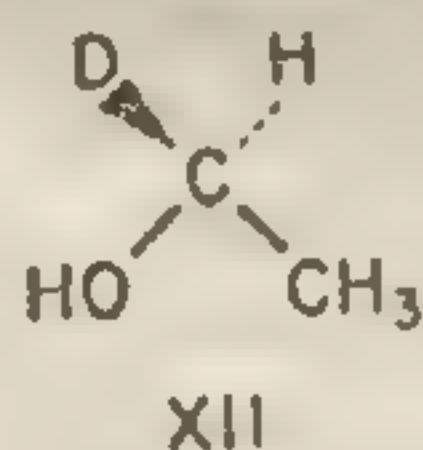


#### 4. ДЕГИДРОГЕНАЗЫ, РЕАГИРУЮЩИЕ С УЧАСТИЕМ ПИРИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Огромное число различных ферментов, участвующих в реакциях окисления — восстановления, действует при прямом специфическом участии пиридиновых нуклеотидов (разд. 3 гл. VII). Во всех этих реакциях от субстрата к (окисленному) коферменту (НАД или НАДФ) переносится один протон и два электрона. В обратной реакции они переносятся от (восстановленного) кофермента к субстрату



Для каждого изучавшегося фермента показано, что процессу переноса водорода свойственна абсолютная стереоспецифичность. Например, при превращении этилового спирта в ацетальдегид, которое катализируется алкогольдегидрогеназой, наблюдается как *стереоспецифическое отщепление* атома водорода от спирта, так и *стереоспецифическое присоединение* его к пиридиновому кольцу кофермента (фиг. 89). Это было доказано посредством синтеза двух монодейтерированных производных этанола (XII и XIII). Стереоспецифичность отщепления и присоединения атома дейтерия подтверждается выделением только одного из двух возможных изомерных монодейтерированных производных восстановленного кофермента (XIV и XV), а также тем





фактом, что только один из двух изомерных дейтерозтанолов может терять дейтерий в ходе окисления.

При изучении стереоспецифичности в широком ряду дегидрогеназ было установлено, что в процессе, катализируемом каким-либо одним ферментом, образуется всегда только один из двух изомеров (XIV или XV). Какой именно изомер образуется, — это зависит от конкретного фермента, катализирующего данную реакцию. Стереоспецифичность этих процессов еще раз подчеркивает, что между ферментным белком, субстратом и коферментом в активном центре должно иметь место весьма упорядоченное многоточечное взаимодействие. Упорядоченные стереоспецифические взаимодействия наводят на мысль о существовании дискретных химических промежуточных соединений, образующихся с участием фермента, кофермента и субстрата (так как именно химические связи накладывают наиболее строгие ограничения на геометрию молекул). Были поставлены многочисленные эксперименты для выявления этих постулированных промежуточных соединений. В такого рода экспериментах можно использовать ряд методических подходов:

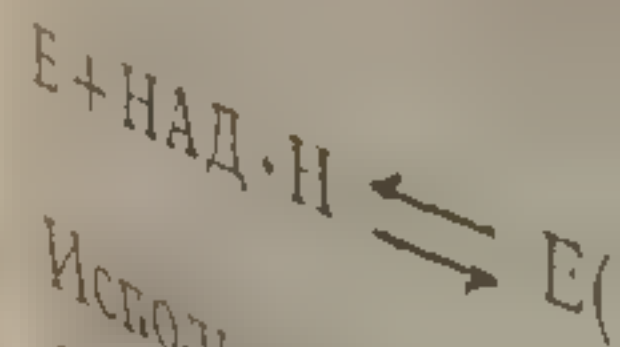
1. Можно изучать связывание кофермента с ферментом в отсутствие субстрата, измеряя сопутствующие этому связыванию изменения спектров флуоресценции или поглощения кофермента. Если равновесная константа диссоциации отличается от стационарной константы Михаэлиса  $K_M$  (разд. 4 гл. IV), то это указывает на образование стехиометрически значимого количества *упорядоченного* химического промежуточного соединения фермент — кофермент — субстрат.

2. Если кинетический анализ доказывает существование упорядоченного механизма реакции [разд. 4 гл. IV, уравнение (IV.22)], то это также можно считать свидетельством в пользу образования дискретных химических промежуточных соединений.

В экспериментах такого типа были получены доказательства образования дискретных промежуточных соединений лишь при определенных условиях и с определенными дегидрогеназами. В других случаях подобных данных получить не удалось. Однако невозможность

продукции...  
обратного...  
случайных...  
чины кинети...  
доказательств...  
экспериментальным...  
дуктов. Так, напри...  
рогеназы равно...  
коферментного комп...  
с константой Михаэ...  
кинетики стационар...  
страта. В то же вр...  
чени с восстановлен...  
личина  $K_M$  значите...  
равновесной конста...  
между двумя дегид...  
ху, разницей в 3...  
констант скоростей...  
тивных превращени...

Для изучения...  
между ферментом...  
использовать спект...  
ценции кофермент...  
ного НАД меняется...  
ментом (алкогольд...  
восстановленного...  
спектра. Методами...  
изучена кинетика...  
щения этанола и...  
гольдгидрогеназо...  
идет по принудите...

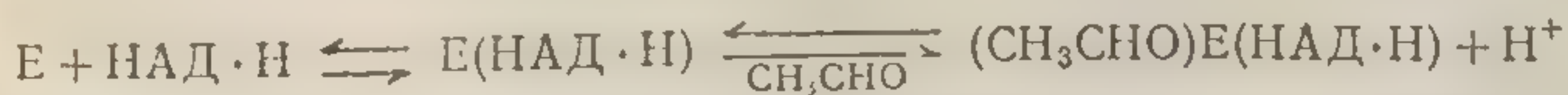
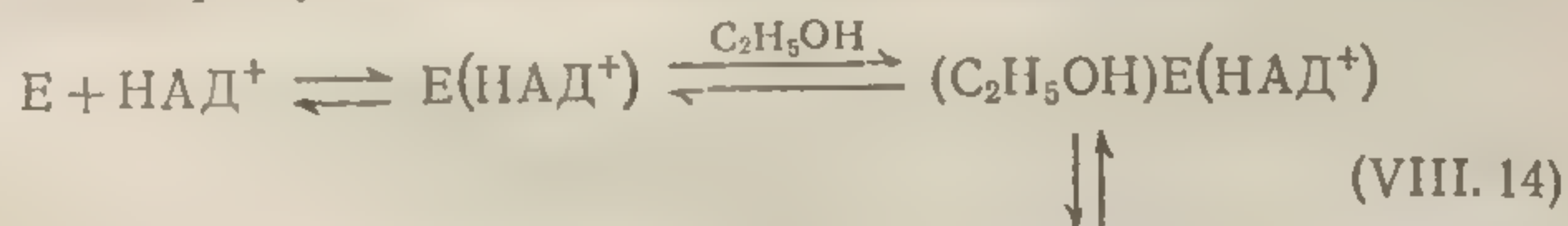


Используя эти да...  
дий в сочетании...  
ционарного состо...  
лимитирующей с...



продемонстрировать упорядоченность механизма не обязательно исключает эту последнюю. Совокупность случайных обстоятельств, определяющих порядок величины кинетических констант скорости в данной последовательности реакций, легко может воспрепятствовать экспериментальному обнаружению промежуточных продуктов. Так, например, для дрожжевой алкогольдегидрогеназы равновесная константа диссоциации фермент-коферментного комплекса достаточно хорошо совпадает с константой Михаэлиса  $K_m$ , определенной исходя из кинетики стационарного состояния в присутствии субстрата. В то же время для алкогольдегидрогеназы печени с восстановленным НАД в качестве субстрата величина  $K_m$  значительно отличается от соответствующей равновесной константы диссоциации. Это различие между двумя дегидрогеназами объясняется, по-видимому, разницей в значении определенных кинетических констант скоростей, а не тем, что сами пути ферментативных превращений в двух этих случаях различны.

Для изучения быстротекущих стадий в реакциях между ферментом, коферментом и субстратом можно использовать спектры поглощения и спектры флуоресценции коферментов. Спектр поглощения восстановленного НАД меняется при связывании кофермента с ферментом (алкогольдегидрогеназой печени). При окислении восстановленного НАД также наблюдается изменение спектра. Методами исследования в быстром потоке была изучена кинетика быстротекущих стадий взаимопревращения этанола и ацетальдегида, катализируемого *алкогольдегидрогеназой печени*. Было показано, что реакция идет по принудительно упорядоченному пути



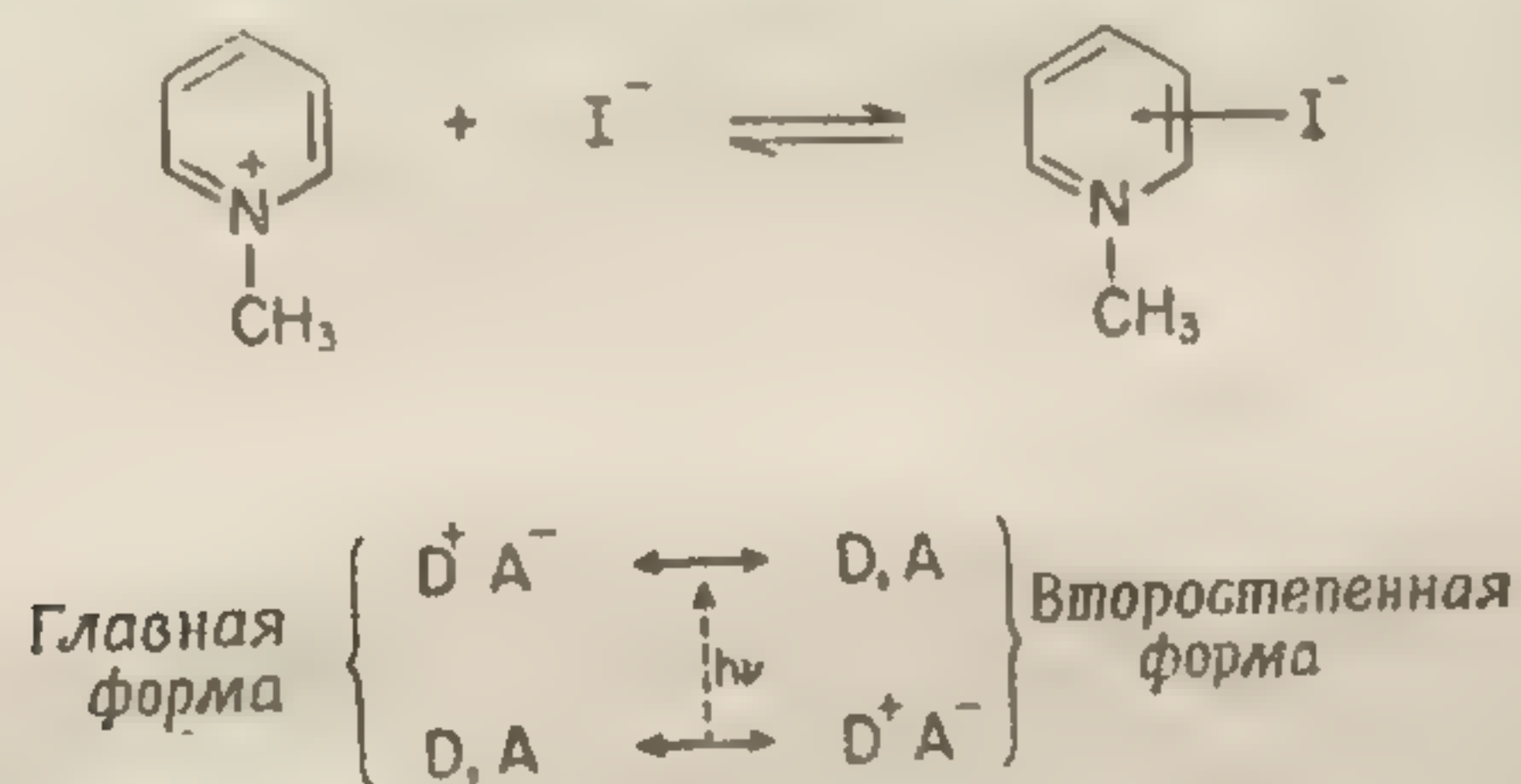
Используя эти данные по кинетике быстротекущих стадий в сочетании с детальным анализом кинетики стационарного состояния, можно установить, что стадией, лимитирующей скорость процесса в обоих направлениях







скорости может быть вычислена из данных по кинетике стационарного состояния. Рассчитанную таким способом величину сравнили с величиной константы диссоциации комплекса фермент — восстановленный кофермент (в отсутствие субстрата), полученной более прямым способом с помощью релаксационных методов (измерение изменений в интенсивности флуоресценции восстановленного кофермента методом температурного скачка). Совпадение оказалось хорошим.



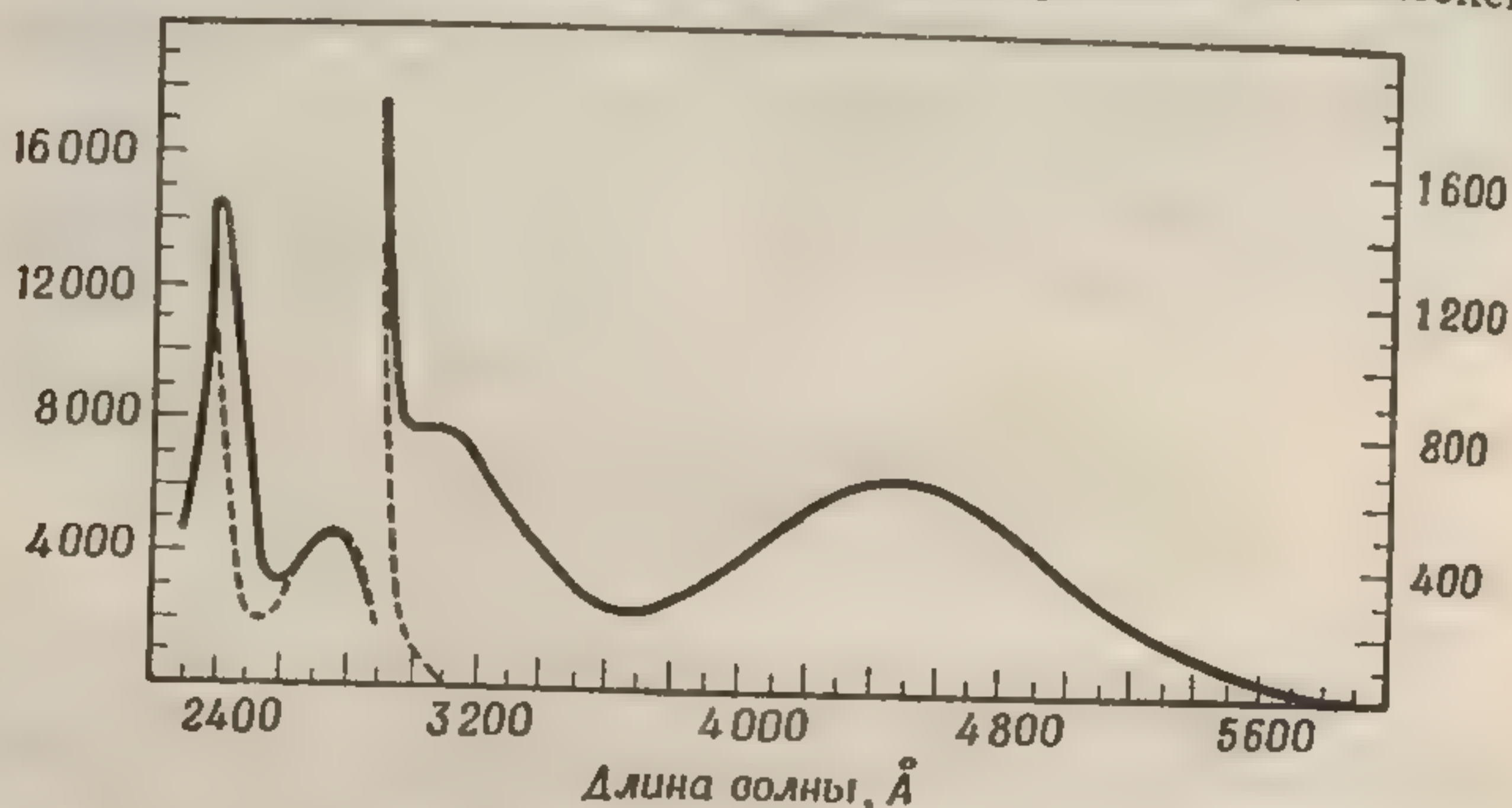
Фиг. 104. Комплекс с переносом заряда в иодиде N-метилпиридиния.

Ферменты, реагирующие с участием пиридиновых нуклеотидов, отличаются от ферментов, содержащих пиридоксальфосфат, тем, что ни для восстановленных, ни для окисленных их форм не существует очевидного химического механизма ковалентного связывания со специфической боковой цепью какой-либо из аминокислот, входящих в состав дегидрогеназ.

Существует предположение, что фермент и окисленный пиридиновый нуклеотид образуют комплекс с переносом заряда. Природу таких взаимодействий с переносом заряда поясняет фиг. 104. Эти взаимодействия не обсуждались нами до сих пор потому, что каких-либо определенных данных о существовании такого рода комплексов в биологических системах почти нет. Удалось, однако, убедительно продемонстрировать перенос зарядов на модельных системах, главным образом на модельных системах с участием пиридиновых колец, что позволяет с помощью данной гипотезы правдоподобно объяснить необычно прочное связывание пиридиновых



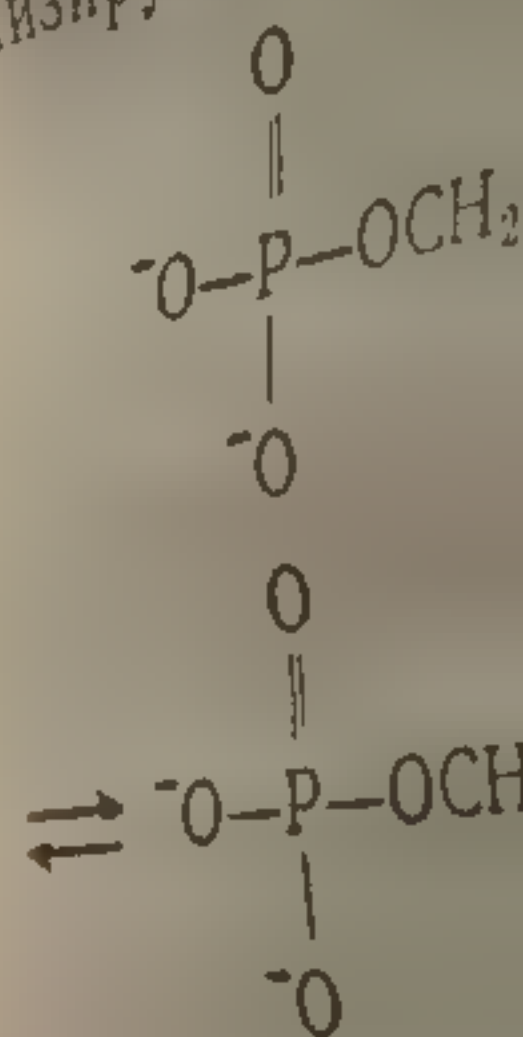
нуклеотидов с активным центром фермента. Возможно, что комплексы с переносом заряда играют важную роль на промежуточных каталитических стадиях ферментативного превращения. Следует отметить, что в комплексе с переносом заряда пиридиниевое кольцо находится в состоянии, промежуточном между окисленной и восстановленной формами кофермента. Комплексы



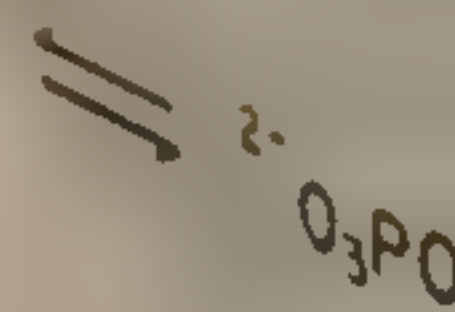
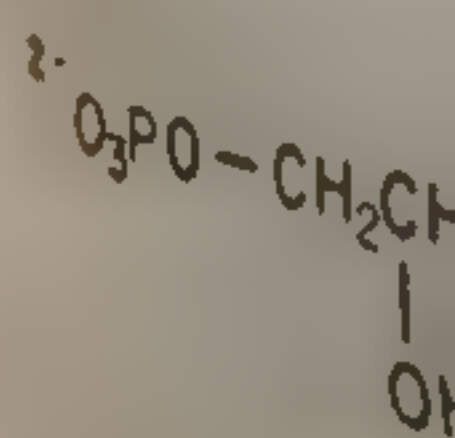
Фиг. 105. Спектры поглощения иодида (—) и перхлората (—) N-этил-4-карбометоксипиридиния в растворе дихлорэтана.

с переносом заряда можно обнаружить по изменению электронных спектров. Для них типично появление широкой, но слабой полосы поглощения, как, например, в комплексе с переносом заряда, образуемом иодидом 1-этил-4-карбометоксипиридиния (фиг. 105). Небольшие спектральные изменения отмечались как при равновесных взаимодействиях пиридиновых нуклеотидов с ферментами в отсутствие субстратов, так и в ходе каталитического процесса (с использованием спектрофотометрии в быстром потоке). Однако с уверенностью приписать эти спектральные изменения образованию комплексов с переносом заряда нельзя. Степень взаимодействия, сопровождающегося переносом заряда, определяется обоими «партнерами» во взаимодействующей паре. Иодид-ион чрезвычайно эффективен в качестве переносящего заряд лиганда. Иодиды пиридиниевых оснований дают значительно более интенсивные спектральные полосы, характерные для переноса заряда, чем

Фермент...  
другие галогениды  
заряд лигандом  
Следует отметить  
держат, по-видимому  
представляет акт  
глицеральдегидфос  
стенна обстоятельс  
последовательнос  
так и для выясн  
действия с субст  
лизирует реакци

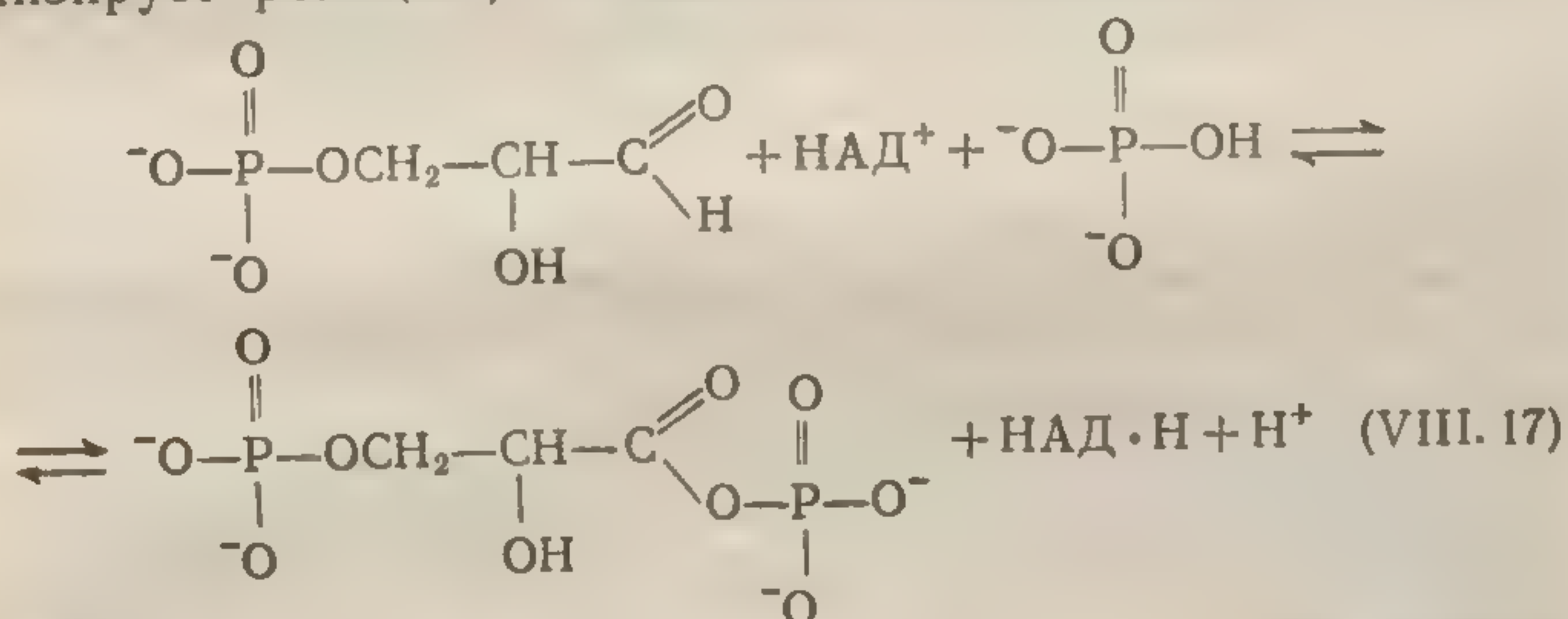


Данная реакц  
так как в про  
нического фос  
ацилфосфат.  
реагирует зат  
риновую кис

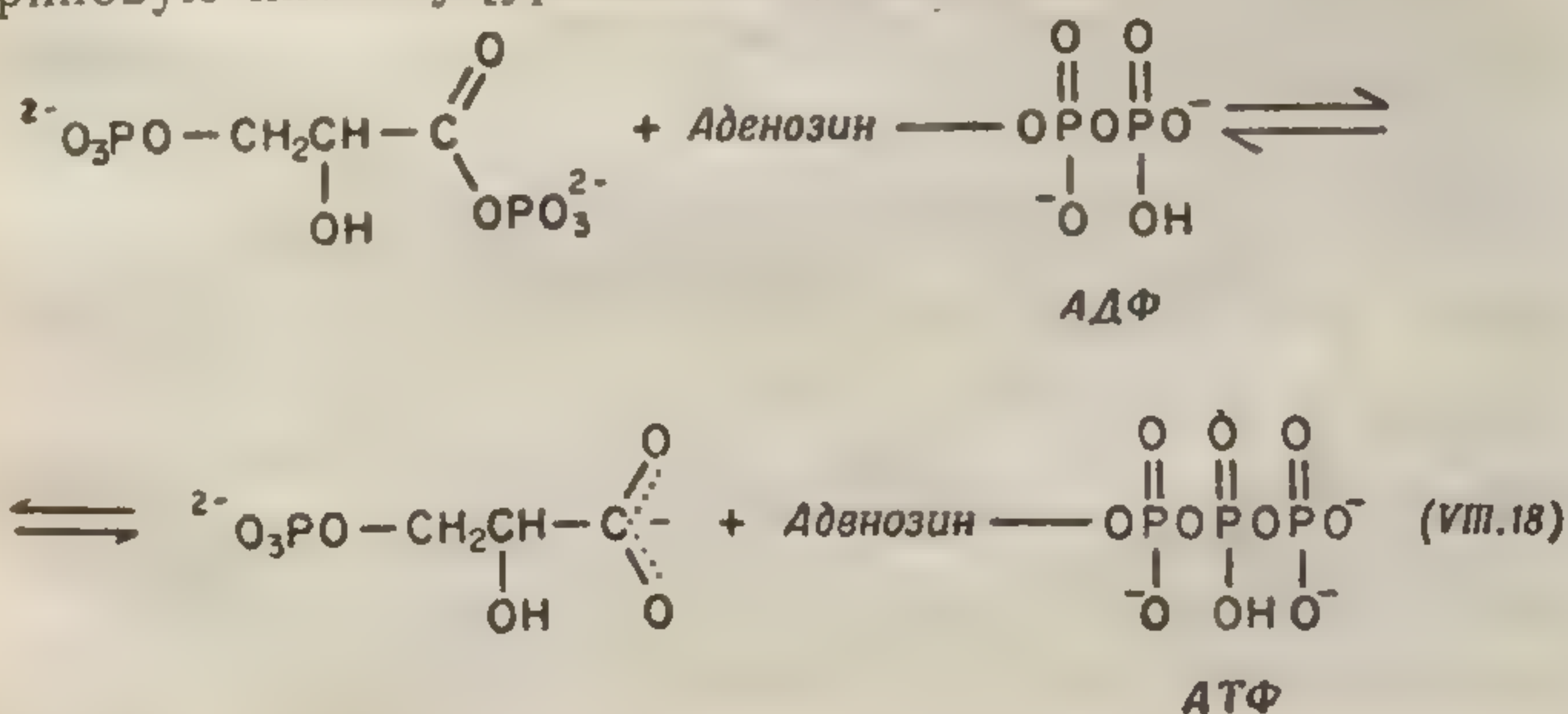




другие галогениды. Весьма эффективным переносящим заряд лигандом является также меркаптид-ион ( $RS^-$ ). Следует отметить, что все изученные дегидрогеназы содержат, по-видимому, хотя бы один активный остаток цистеина на каталитический центр. Особый интерес представляет активный остаток цистеина в молекуле глицеральдегидфосфатдегидрогеназы. Этот остаток цистеина обстоятельно изучали как с целью установления последовательности аминокислот в активном центре, так и для выяснения природы каталитического взаимодействия с субстратом и коферментом. Фермент катализирует реакцию, описываемую уравнением (VIII.17).

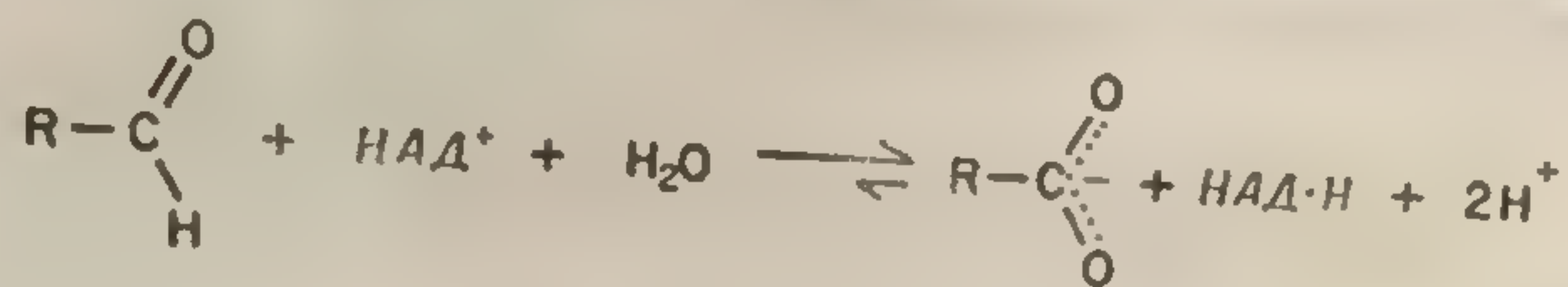


Данная реакция имеет большое значение в гликолизе, так как в процессе окисления альдегида 1 моль неорганического фосфата превращается в богатый энергией ацилфосфат. Этот продукт (3-фосфоглицерилфосфат) реагирует затем с АДФ, образуя АТФ и 3-фосфоглицериновую кислоту [уравнение (VIII.18)].





Ступенчатое превращение глицеральдегид-3-фосфата в 3-фосфоглицериновую кислоту служит отличным примером осуществляемой ферментами регуляции взаимопревращений метаболитов. Обе реакции [уравнения (VIII.17) и (VIII.18)] имеют конечные константы равновесия, и в ходе суммарной реакции окисления из АДФ и фосфата образуется 1 моль АТФ (энергетически невыгодный процесс). Термодинамически более выгодной реакцией было бы прямое окисление глицеральдегид-3-фосфата при помощи НАД с образованием 3-фосфоглицериновой кислоты и восстановленного НАД.



(VIII.19)

Этот прямой путь реакции привел бы вместо синтеза АТФ к рассеянию тепловой энергии. Поэтому при исследовании промежуточного обмена веществ особый интерес представляет детальное изучение того опосредованного ферментами регуляторного механизма, при помощи которого глицеральдегид-3-фосфат превращается в «богатую энергией» промежуточную дифосфоглицериновую кислоту.

В отсутствие неорганического фосфата или его аналогов (арсенат) в системе, содержащей фермент и субстрат, не происходит заметного восстановления НАД. Скорость ферментативного восстановления НАД зависит от концентрации фосфата. Если пометить субстрат радиоактивным изотопом, то можно показать, что в присутствии НАД, но в отсутствие фосфата радиоактивная метка прочно присоединяется к ферментному белку и что, добавив в систему фосфат, можно вызвать удаление метки. Отсюда следует, что фосфат реагирует непосредственно с фермент-субстратным промежуточным соединением. Фермент может быть стехиометрически инактивирован путем обработки ферментного белка алкилирующими агентами, например подуксусной кисло-

той. Такое S-карбоксиметилирование фрагмента было бы взаимным. Другие взаимные превращения, например, про-

нативные сложные эфиры, например, ацетатом. Периодически инертны. Если это не радиация, а за счет ферментов, то фрагмент, следовательно, можно показать боксиметилирование цистеина. Веским аргументом является альдегид, непосредственно 3-фосфоглицерин.

НАД<sup>+</sup> + R-C=O

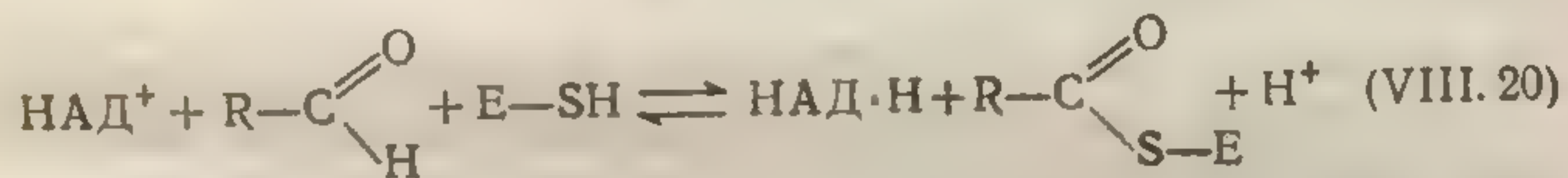
Тиоэфиры — ные эфиры. нуклеофильная атака приводит к образованию

R-C=O + SR' → R-C(SR')=O

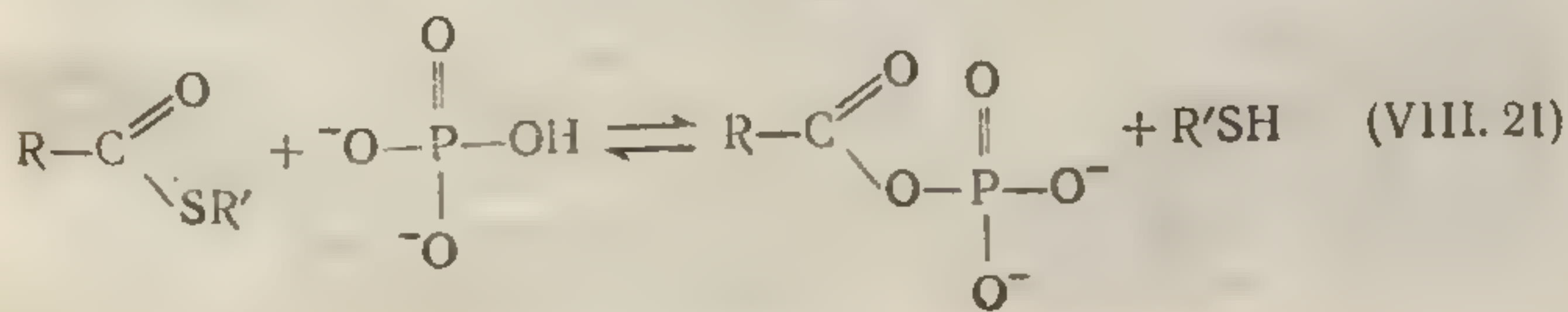


той. Такое алкилирование приводит к образованию S-карбоксиметилцистеинил-фермента (из продуктов фрагментации денатурированного производного фермента был выделен S-карбоксиметилцистеинил-пептид). Другие взаимодействующие с тиолами реагенты (например, производные ртути) также инактивируют фермент.

Нативный фермент реагирует с богатыми энергией сложными эфирами кислот, например с *n*-нитрофенил-ацетатом. При этом образуется ацилфермент, каталитически инертный по отношению к природным субстратам. Если это неактивное производное подвергнуть денатурации, а затем расщеплению (при помощи протеолитических ферментов), то удастся выделить пептидный фрагмент, содержащий S-ацетилцистеин. Анализируя последовательность аминокислот вблизи этого остатка, можно показать, что реакции S-ацетилирования и S-карбоксиметилирования затрагивают один и тот же остаток цистеина. Эксперименты с ацетилированием служат веским аргументом в пользу того, что субстрат реакции, альдегид, в присутствии кофермента реагирует непосредственно с ферментным белком, образуя тиоэфир 3-фосфоглицериновой кислоты:

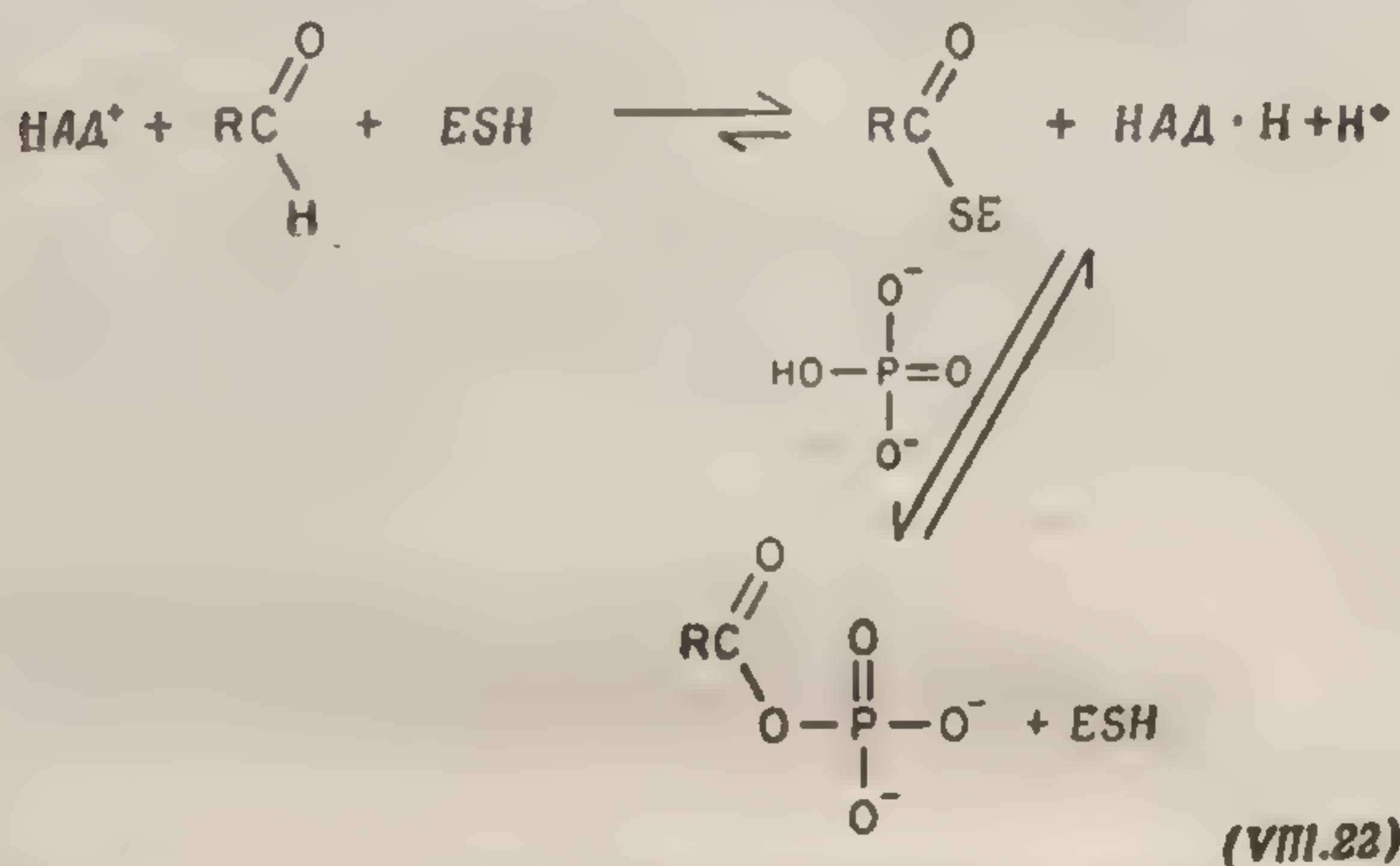


Тиоэфиры — это относительно «богатые энергией» сложные эфиры. В модельных (неферментативных) системах нуклеофильная атака тиоэфиров фосфат-ионом приводит к образованию значительных количеств соответствующего смешанного ангидрида фосфорной кислоты





Влияние концентрации фосфата на общую скорость восстановления НАД можно объяснить с помощью механизма, описываемого уравнением (VIII.22).



При низких концентрациях фосфата скорость реакции прямо пропорциональна его концентрации, тогда как при очень высоких концентрациях суммарная скорость реакции не зависит от концентрации фосфата. Этого результата можно ожидать, если вторая стадия рассматриваемого процесса [уравнение (VIII.22)] является стадией, контролирующей скорость, только при низких, но не при высоких концентрациях фосфата.

Интересно отметить, что последовательность аминокислот на участке ковалентной пептидной цепи, содержащем реакционноспособный остаток цистеина, одинакова в глицеральдегидфосфатдегидрогеназах, выделенных из самых разных организмов (разд. 5 гл. III). Эта последовательность одинакова в ферментах, выделенных из микроорганизмов (дрожжи) и из тканей млекопитающих. Весьма вероятно поэтому, что она отражает некую уникальную зависимость функции от структуры в данном участке белковой молекулы фермента. Любопытно сравнить и другие данные об одноименных ферментах, полученных из разных организмов. Лучше всего изучены ферменты, выделенные из мышц кролика и из дрожжей. Оба эти фермента — достаточно крупные белковые молекулы с молекулярным весом около

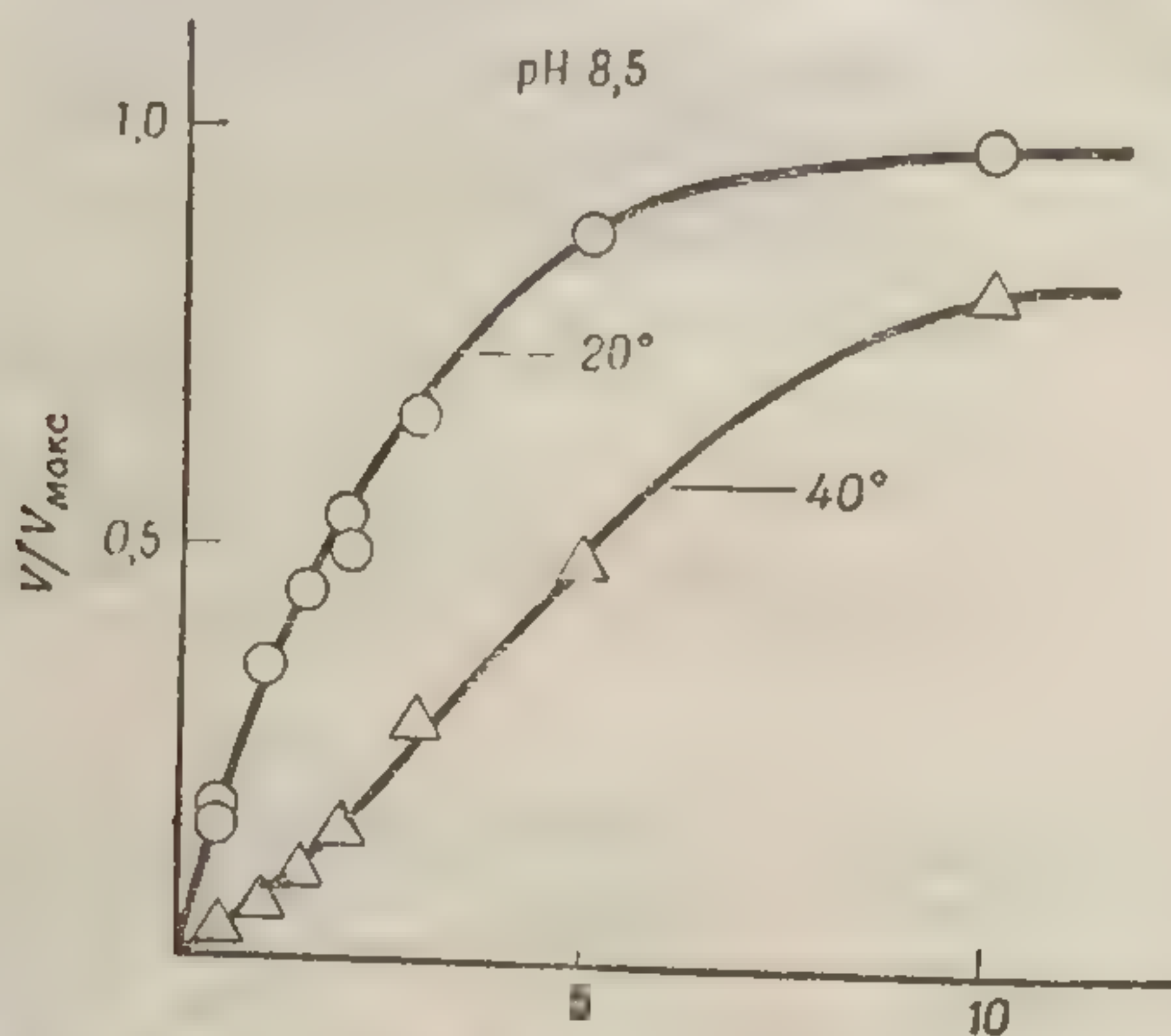


140 000. Аминокислотный состав их известен. Располагая этими данными и учитывая специфичность протеолитического действия фермента трипсина (разрывающего связи, в образовании которых участвуют остатки лизина и аргинина), можно рассчитать число различных пептидов, которые могут образоваться при протеолизе такого белка с молекулярным весом 140 000. В действительности получаемое число различных пептидов примерно в 4 раза меньше этой расчетной величины. Более того, число реакционноспособных остатков цистеина, определяемое титрованием при помощи иодацетата, равно 4 на частицу с молекулярным весом 140 000. Можно также определить число активных центров на частицу с молекулярным весом 140 000, наблюдая за тушением флуоресценции восстановленного НАД при его связывании ферментом. И здесь получающиеся результаты говорят о существовании четырех центров на частицу с молекулярным весом 140 000. Фермент из мышц кролика и фермент из дрожжей состоят, по-видимому, из четырех идентичных полипептидных субъединиц, содержащих каждая по одному активному центру. Построение активной молекулы фермента из упорядоченной совокупности полипептидных субъединиц — характерная особенность всех изученных дегидрогеназ. В глицеральдегидфосфатдегидрогеназе каждый из этих четырех внутримолекулярных центров функционирует, по-видимому, независимо от других при физиологических условиях, когда зависимость скорости реакции от концентрации субстрата или кофермента точно совпадает с тем, чего следует ожидать на основе модели Михаэлиса — Ментен (подразумевающей, что все каталитические центры эквивалентны и независимы). Это не всегда справедливо для ферментов, молекула которых состоит из нескольких субъединиц. Так, для дрожжевой глицеральдегидфосфатдегидрогеназы при температурах 40° и выше зависимость скорости реакции от концентрации кофермента описывается сигмоидальной кривой (фиг. 106); при комнатных же температурах какого-либо взаимодействия субъединиц не наблюдается.

Для всех изученных дегидрогеназ было показано, что их молекулы состоят по меньшей мере из двух



(четырёх, восьми) субъединиц и соответствующего числа активных центров. Иногда, как у глицеральдегидфосфатдегидрогеназы при комнатной температуре, не наблюдается явного взаимодействия в ансамбле субъединиц или центров, насколько можно судить по зависимости



Фиг. 106. Зависимость скорости окисления глицеральдегид-3-фосфата, катализируемого глицеральдегидфосфатдегидрогеназой дрожжей, от концентрации  $\text{NAD}^+$  при 20 и 40°.

$$V_{\text{max}} (20^\circ)/V_{\text{max}} (40^\circ) = 2.2.$$

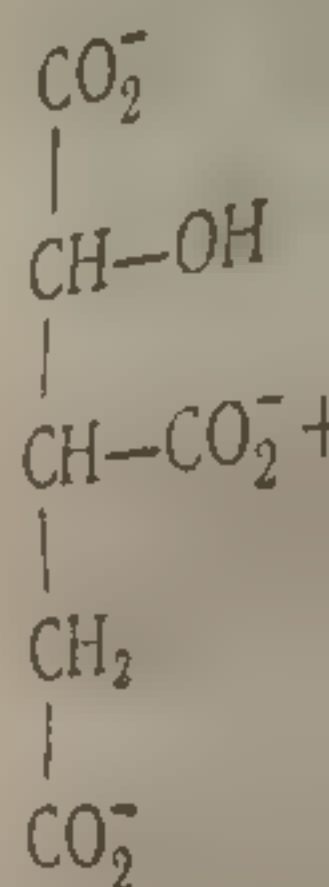
скорости реакции от концентрации субстратов и эффекторов. В следующем разделе мы рассмотрим дегидрогеназу, у которой сильные кооперативные взаимодействия между субъединицами отчетливо проявляются в кинетике реакций.

##### 5. АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ: ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗА И АСПАРТАТТРАНСКАРБАМИЛАЗА

Ферменты, у которых каталитическая активность одного из центров зависит от степени связывания субстрата или эффектора на других центрах (вследствие взаимодействия белковых субъединиц), получили название

аллостерические ферменты, регулирующие метаболические процессы в клетке.

Изоцитратдегидрогеназа



Изоцитрат

Подобрав условия, можно показать, что скорость реакции зависит от концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  и аденина. Реакция может быть ускорена за счет появления продукта реакции (та) изображенного.

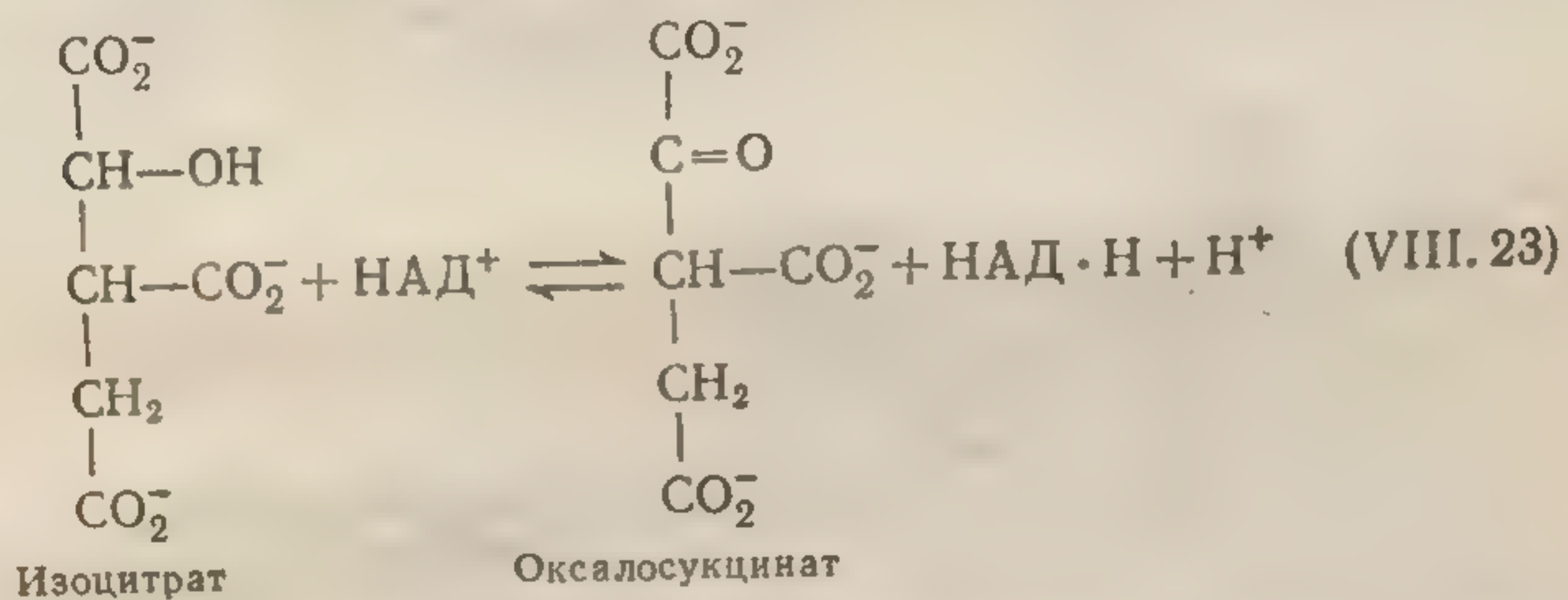
Термин аллостерический фермент используется для обозначения фермента, активность которого регулируется связыванием субстрата и эффекторов (эффекторов), влияющих на активность фермента. Такие ферменты были установлены в 1940-х годах и стали называться аллостерическими ферментами.



аллостерических ферментов<sup>1</sup>. Полагают, что аллостерические эффекторы ферментов играют важную роль в регуляции метаболических процессов. Поэтому молекулярные детали взаимодействия субъединиц и вопрос о влиянии концентрации эффектора на кинетику катализируемых реакций привлекают к себе значительное внимание.

### Изоцитратдегидрогеназа

Изоцитратдегидрогеназа катализирует окисление изоцитрата в оксалосукцинат посредством НАД<sup>+</sup>:

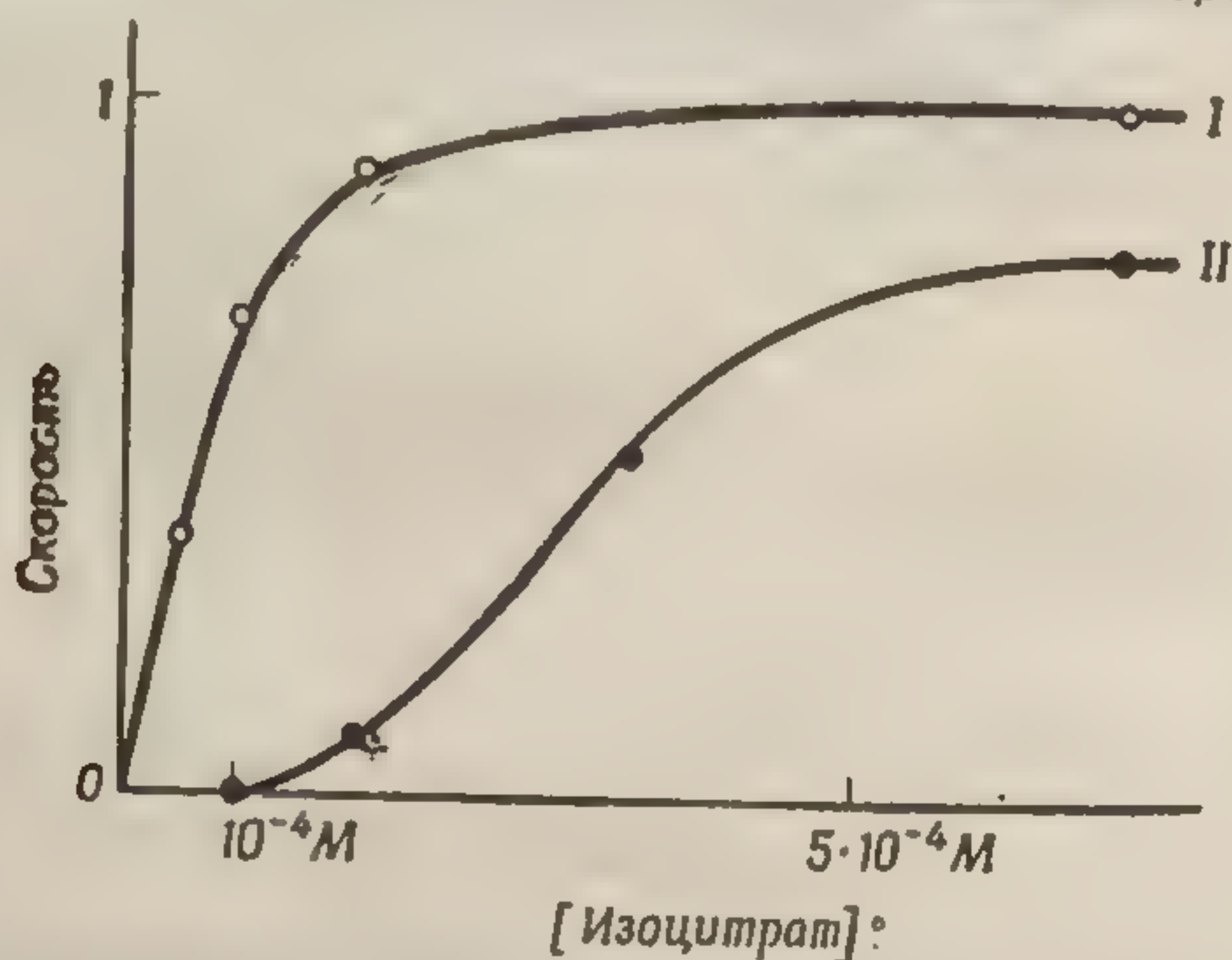


Подобрав подходящие концентрации, можно показать, что скорость реакции зависит от двух веществ, не играющих явной роли согласно стехиометрическому уравнению реакции [уравнение (VIII.23)], а именно от  $\text{Mg}^{2+}$  и адениловой кислоты (АМФ). Скорость прямой реакции можно измерять, наблюдая спектрофотометрически за появлением восстановленного НАД. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (изоцитрата) изображена на фиг. 107. Следует обратить внимание

<sup>1</sup> Термин *аллостерия* был первоначально предложен Ж. Моно для обозначения зависимости, которая существует между активностью некоторых ферментов и присутствием определенных веществ (эффекторов), значительно отличающихся по своей структуре от субстрата и присоединяющихся к белку в особом участке, отличном от центра связывания субстрата. Связь между аллостерической регуляцией активности и изменениями конфигурации олигомерных ферментов была установлена позднее. Вслед за этим некоторые авторы стали неправомерно распространять термин *аллостерия* на кооперативные взаимодействия между одноименными (идентичными) субстратными центрами в субъединицах олигомерного белка. — Прим. ред.



на сигмоидальную форму кривой (в системах, подчиняющихся кинетике Михаэлиса — Ментен, эта зависимость описывается гиперболой). При более высоких концентрациях субстрата кривая по форме напоминает кривую, характерную для практически одноцентрового фермента. При низких же концентрациях субстрата реакция подчиняется кинетике не первого, а более высокого порядка. Такое кинетическое поведение проще всего



Фиг. 107. Зависимость скорости реакции от концентрации изоцитрата для изоцитратдегидрогеназы дрожжей (D. E. Atkinson et al., J. Biol. Chem., 240, 2682, 1965).

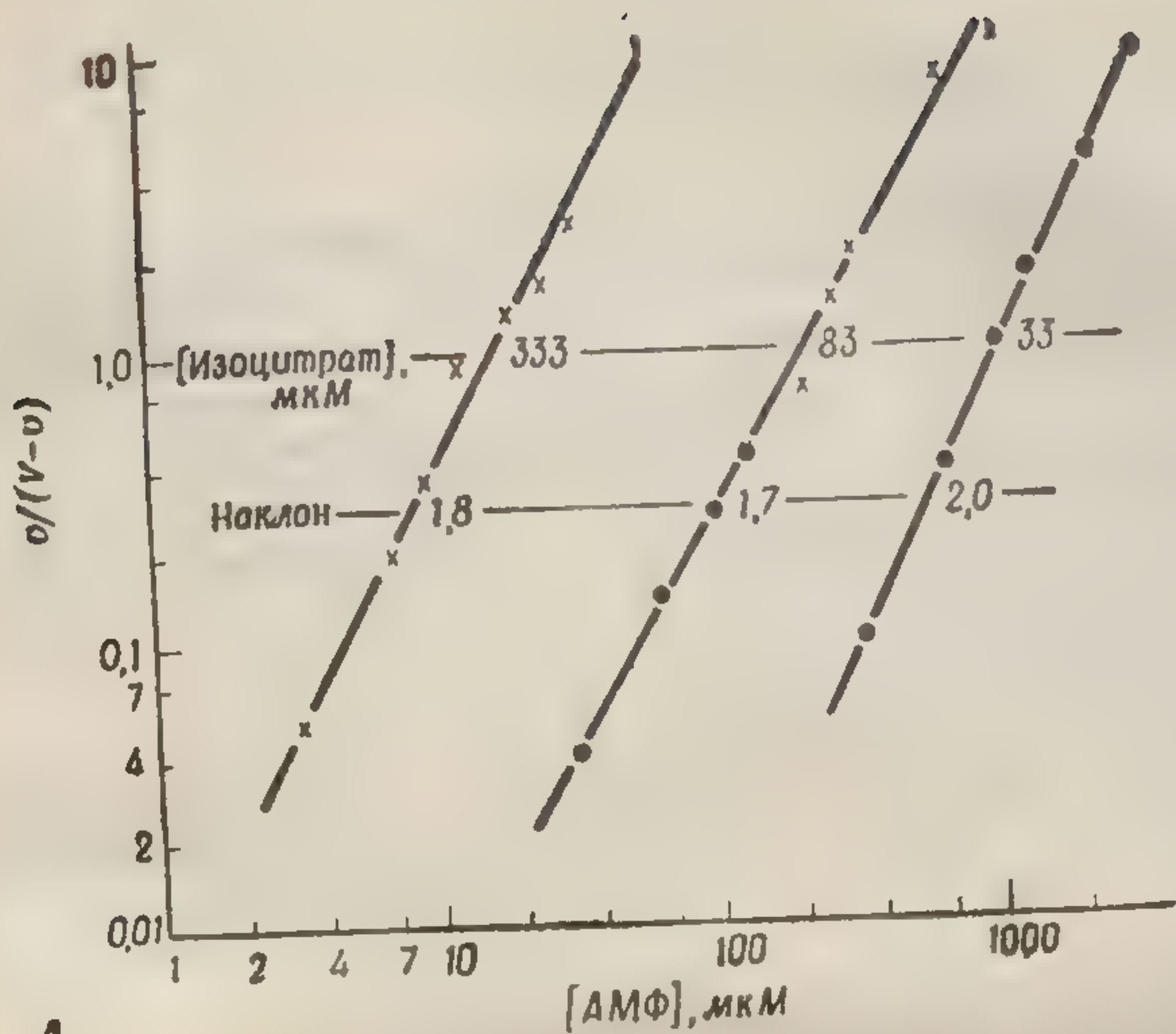
I — в присутствии положительного эффектора (АМФ); II — в отсутствие эффектора.

объясняется взаимозависимостью каталитических центров, выражающейся в том, что связывание субстрата на одном из центров приводит к увеличению каталитической эффективности других центров. Кооперативность взаимодействия каталитических центров наиболее очевидна при низких концентрациях субстрата, при которых доля центров, содержащих связанный субстрат, мала. Аллостерические эффекторы, сильно влияющие на скорость реакции при низких концентрациях субстрата, при высоких его концентрациях либо оказывают слабое действие, либо совсем не действуют.

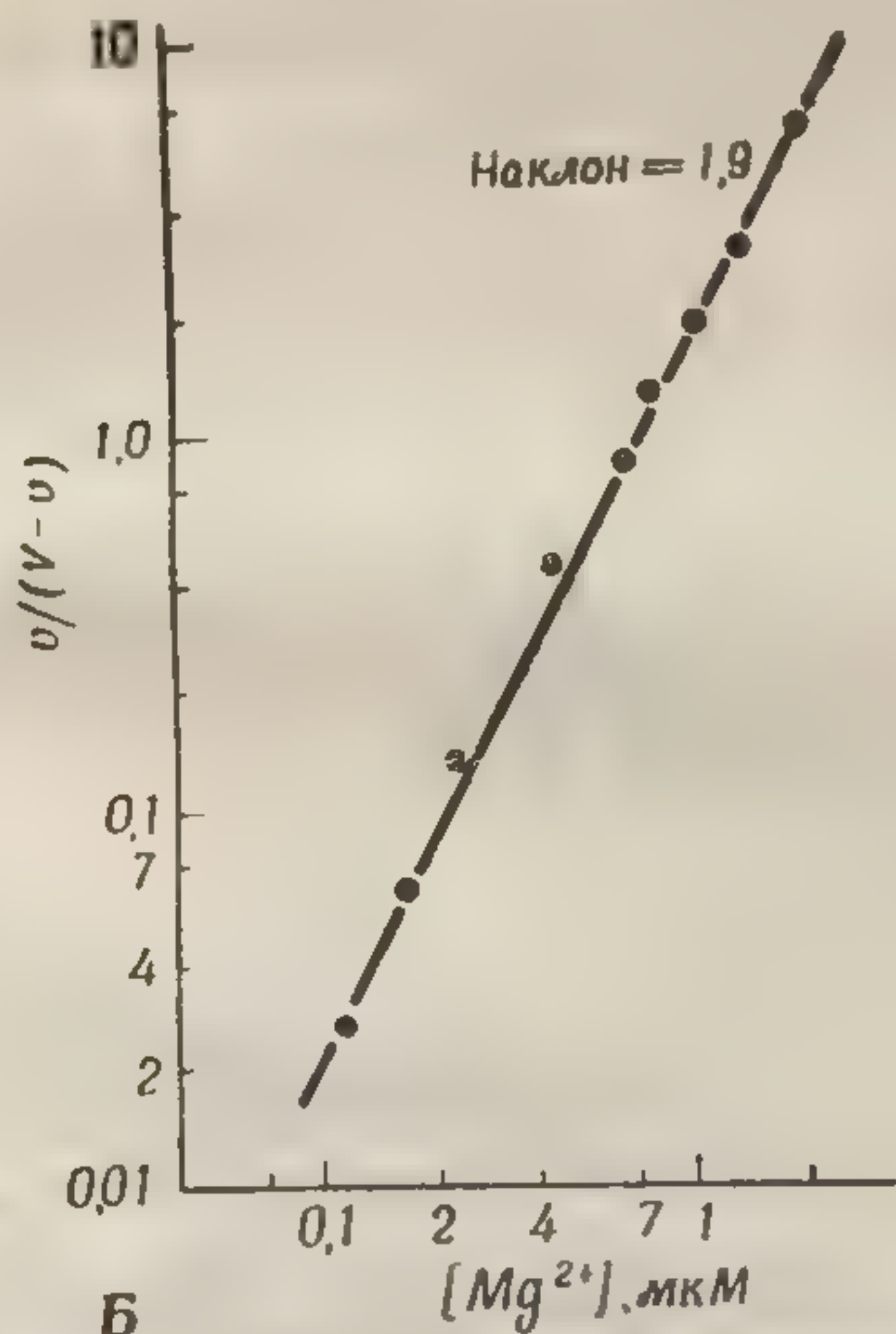
Зависимость скорости реакции от присутствия АМФ и  $Mg^{2+}$  представлена на фиг. 108. При достаточно низких

Фиг. 108. Зависимость скорости реакции для изоцитратдегидрогеназы дрожжей от присутствия АМФ и  $Mg^{2+}$ . А. При переменном  $Mg^{2+}$ ; Б. При переменном АМФ.





А



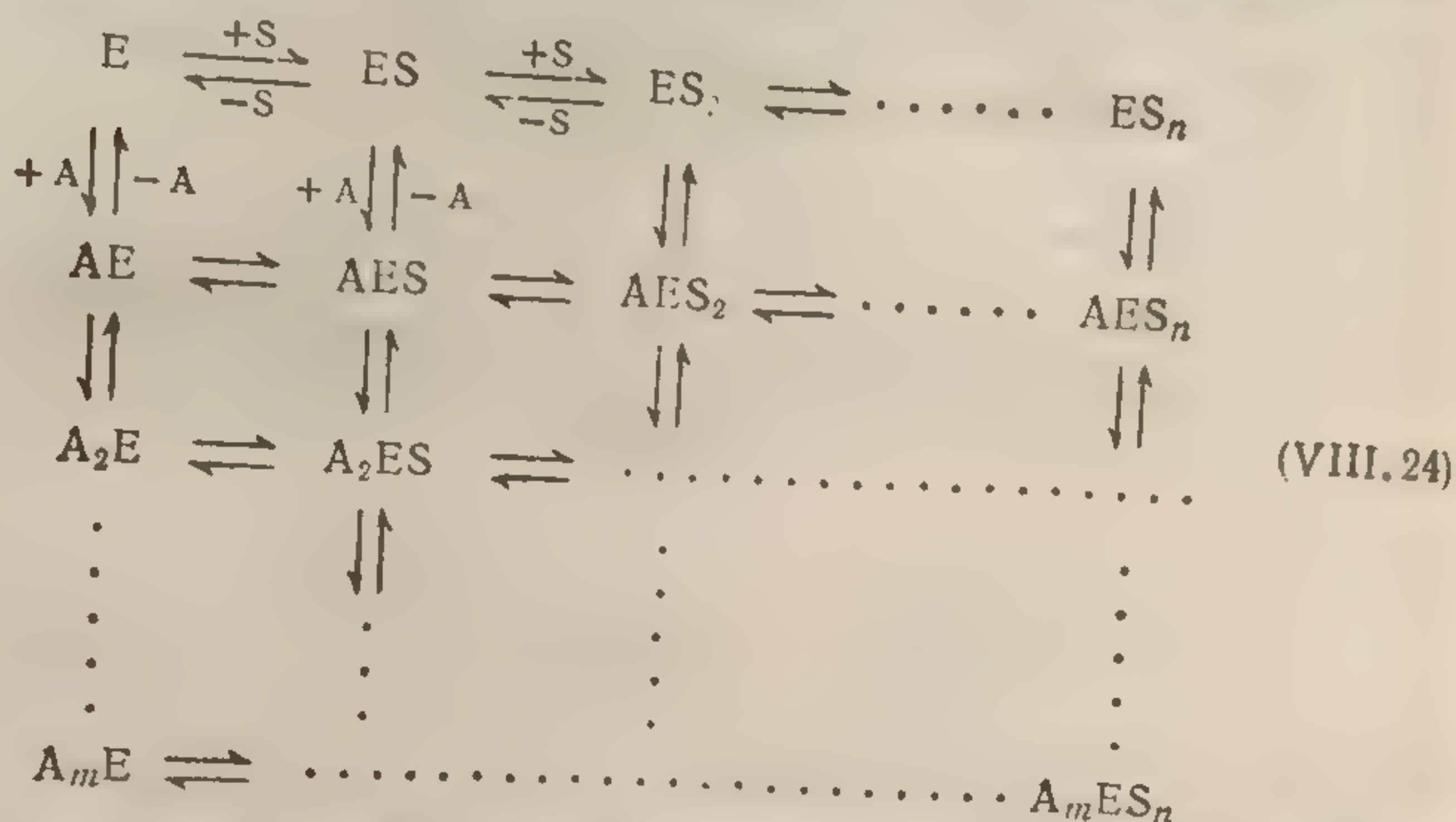
Б

Ф и г. 108. Зависимость скорости реакции от концентрации эффектора для изоцитратдегидрогеназы при низких (фиксированных) концентрациях изоцитрата и кофермента (D. E. Atkinson et al., J Biol Chem., 240, 2682, 1965).

А. При переменных низких концентрациях АМФ. Б. При переменных низких концентрациях  $Mg^{2+}$ .



концентрациях субстрата скорость реакции пропорциональна квадрату концентрации каждого из этих двух аллостерических эффекторов. Если между каталитическими центрами существуют сильные кооперативные взаимодействия, то число взаимодействующих центров можно оценить, исходя из следующих соображений. Рассмотрим общую модель, описываемую уравнением (VIII.24)



Суммарная скорость реакции будет складываться из скоростей, свойственных различным распределениям заполненных и пустых центров [уравнение (VIII.25)]:

$$v = \sum_{i=0}^{l-m} \sum_{j=1}^{j=n} (k_{ij} [A_iES_j]). \quad (\text{VIII.25})$$

Обозначим через  $Y_i$  число заполненных центров связывания эффектора на молекулу при условии, что общее число таких центров в молекуле равно  $m$ . Для того чтобы наблюдалась кооперативность, необходимо, чтобы скорость катализируемой реакции или степень связывания субстрата росла быстрее, чем увеличивается экспериментальная переменная  $Y_i/m$ . Из алгебраического решения для случая равновесных концентраций различных комплексов  $([A_iES_j])$  следует, что при низких концентрациях эффектора ( $Y_i/m \ll 1$ ) и при соответственно низких концентрациях субстрата ( $Y_j/n \ll 1$ ) из-

мечены общей с  
градиент положите  
следующим выраже  
 $v = C_m [A]^m + C_{m-1}$

где  $C_m, \dots, C_0$  —  
различных конст  
стей и (фиксиров  
При указанных у  
фициенты  $C_{m-i}$  у  
Следовательно, в  
ций уравнение  
применимым при

Уравнения (VIII  
гда, когда много  
и субстратных п  
от  $\lg[A]$  может  
чениях концент  
правильным инт  
оперативных (а  
( $m$  и  $n$  часто на  
Аналогичные  
мого концент  
страта (при та  
концентрацию  
уравнению того  
акции от конце  
ванных концент

В этом случае  
величина  $n$  мо  
центрация эфф  
Изменится ли  
ческого эффект



менение общей скорости реакции с изменением концентрации положительного эффектора будет описываться следующим уравнением:

$$v = C_m [A]^m + C_{m-1} [A]^{m-1} + C_{m-2} [A]^{m-2} + \dots + C_0, \quad (\text{VIII. 26})$$

где  $C_m, \dots, C_0$  — коэффициенты, зависящие от значений различных констант равновесия ( $K_{ij}$ ), констант скоростей и (фиксированной) низкой концентрации субстрата. При указанных условиях (низкие концентрации) коэффициенты  $C_{m-i}$  уменьшаются по мере уменьшения  $m - i$ . Следовательно, в пределах этого интервала концентраций уравнение (VIII.26) можно заменить практически применимым приближенным выражением

$$v \sim C_m [A]^m, \\ \lg v \sim \text{const} + m \lg [A]. \quad (\text{VIII. 27})$$

Уравнения (VIII.25) и (VIII.26) приложимы только тогда, когда многие или большая часть аллостерических и субстратных центров незаняты. Хотя зависимость  $\lg v$  от  $\lg [A]$  может оставаться линейной и при других значениях концентрации, в таких случаях будет не всегда правильным интерпретировать наклон  $m$  как число кооперативных (аллостерических) центров на молекулу ( $m$  и  $n$  часто называют коэффициентом Хилла).

Аналогичные рассуждения относительно определяемого концентрацией поведения аллостерического субстрата (при таких же ограничениях, накладываемых на концентрацию эффектора) приводят к приближенному уравнению того же типа для зависимости скорости реакции от концентрации субстрата при низких фиксированных концентрациях эффектора

$$\lg v = \text{const} + n \lg [S]. \quad (\text{VIII. 28})$$

В этом случае также экспериментально определяемая величина  $n$  может измениться, если фиксированная концентрация эффектора довольно значительна ( $Y_i/m \rightarrow 1$ ). Изменится ли  $n$  с изменением концентрации аллостерического эффектора или нет, это будет зависеть от того,



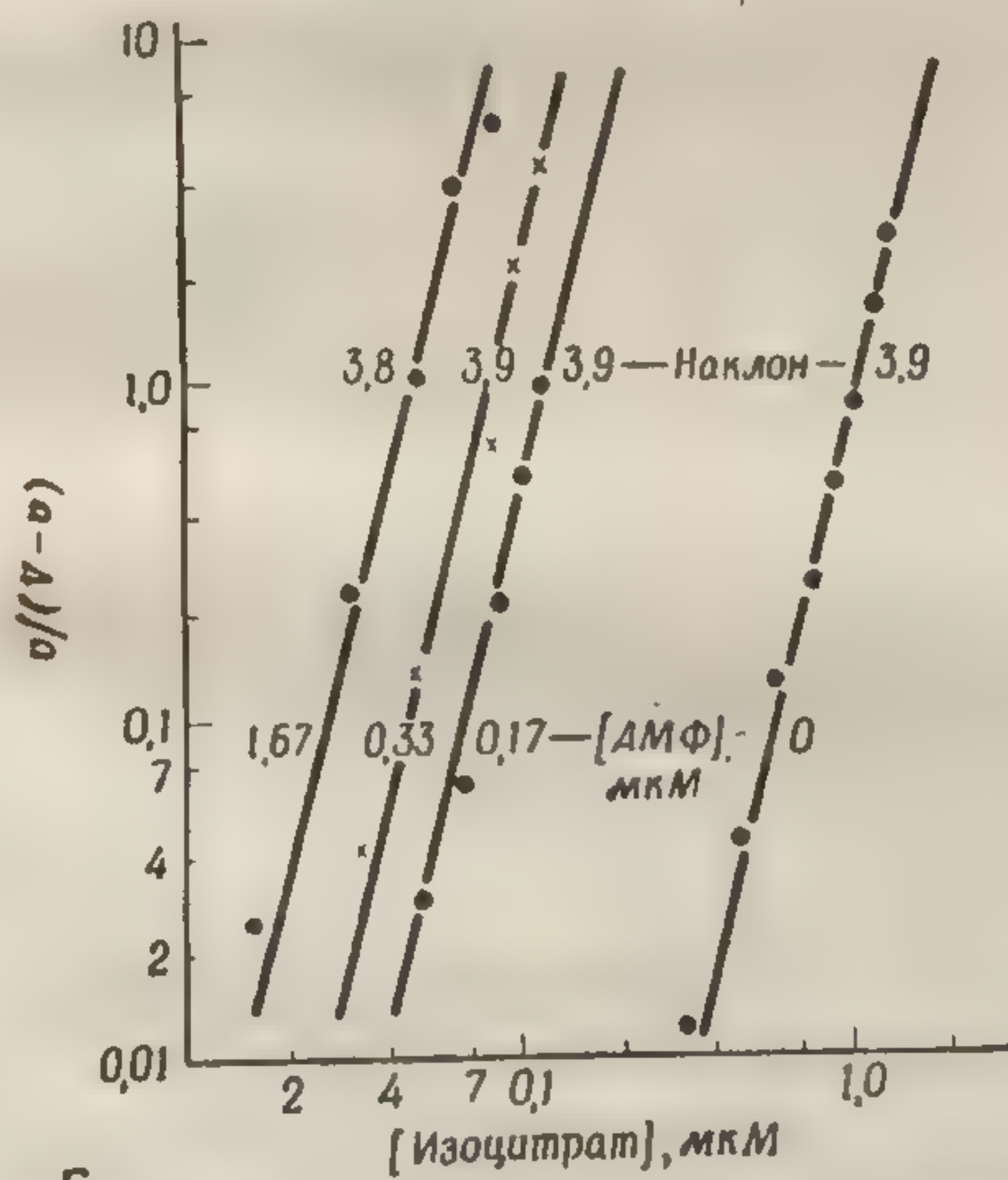
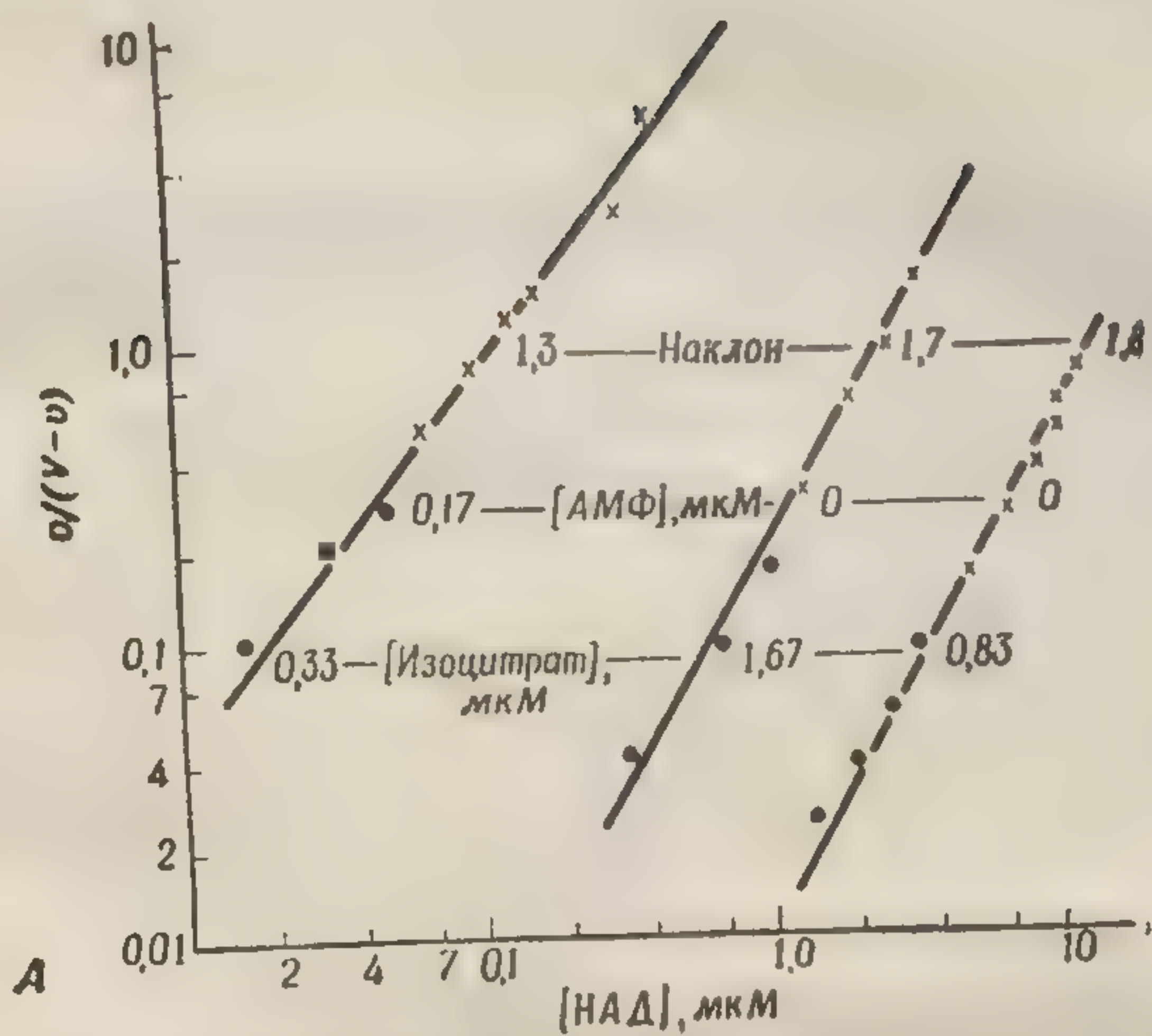
функционируют ли эффектор и субстрат независимо друг от друга (хотя и с соблюдением кооперативности внутри совокупности *однотипных* центров одной молекулы) или же имеют место кооперативные взаимодействия разнотипных центров с участием более чем одной субъединицы, связавшей субстрат, и более чем одной субъединицы, связавшей эффектор, на каждую молекулу фермента<sup>1</sup>.

На фиг. 108 и 109 показано для изоцитратдегидрогеназы число кооперативных (аллостерических) центров связывания эффектора  $m$  и число центров связывания субстрата  $n$  в предположении полной кооперативности ( $E + mA \rightleftharpoons EA_m$ ). Такой анализ приводит к интересному выводу, что молекула изоцитратдегидрогеназы содержит четыре аллостерических центра связывания изоцитрата и только два центра связывания НАД<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> и АМФ.

Катализируемая ферментом реакция [уравнение (VIII.23)] ингибируется цитратом — молекулой, сходной по структуре с изоцитратом. При более высоких концентрациях изоцитрата (и цитрата) ингибирование цитратом носит обычный конкурентный характер. Однако при очень низких концентрациях изоцитрата (например, при концентрациях, лежащих ниже точки перегиба на фиг. 107) наблюдается *активация* цитратом. По-видимому, ингибитор цитрат, присоединяясь к некоторым центрам связывания изоцитрата, увеличивает потенциальную каталитическую эффективность других таких центров (незанятых). Поскольку при низких концентрациях субстрата и ингибитора скорость катализа зависит не от первой, а от более высокой степени концентрации субстрата, связывание конкурентного ингибитора, так же как и связывание субстрата, будет усиливать катализ, если только значительная доля центров связывания изоцитрата останется незанятой. Активация конкурентным ингибитором в этих условиях является убедительным свидетельством в пользу кооперативности центров связывания.

<sup>1</sup> Следует отметить, что в общем случае коэффициент Хилла  $n$  есть величина переменная, зависящая от концентрации субстрата и эффекторов. — Прим. ред.



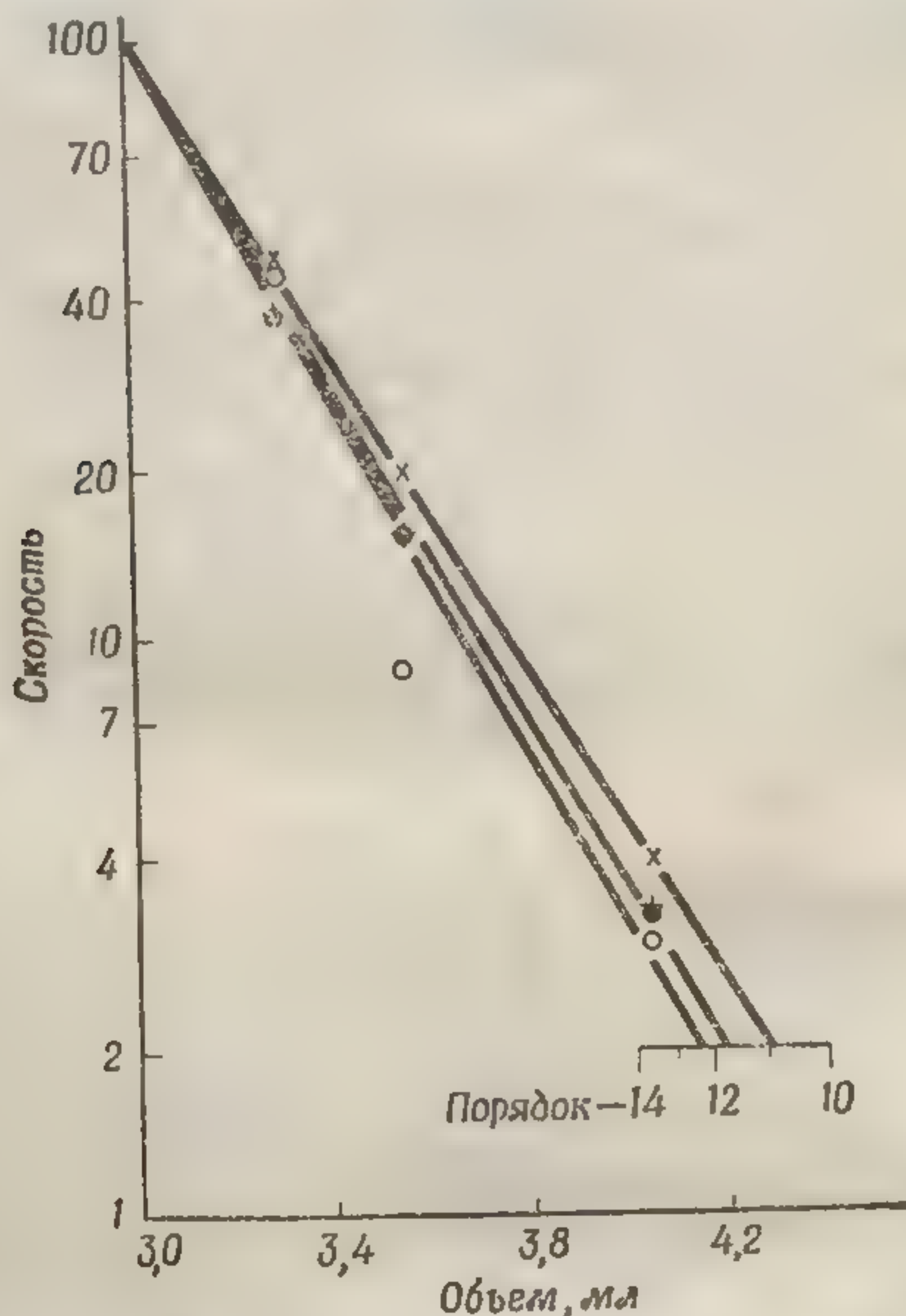


Фиг. 109. График зависимости между скоростью реакции и концентрацией субстрата, соответствующий уравнению  $v/(V-v) = [c]^n/K$  (D. E. Atkinson et al., J. Biol. Chem., 240, 2682, 1965).

А. Переменные концентрации  $НАД^+$  при фиксированных низких концентрациях изоцитрата и АМФ. Б. Переменные концентрации изоцитрата при фиксированных низких концентрациях  $НАД^+$  и АМФ.



Можно было бы предположить, что описанные выше кооперативные эффекты вызываются диссоциацией и



Фиг. 110. Зависимость скорости реакции, катализируемой изоцитратдегидрогеназой, от изменения концентрации всех компонентов реакционной смеси (D. E. Atkinson et al., J. Biol. Chem., 240, 2682, 1965).

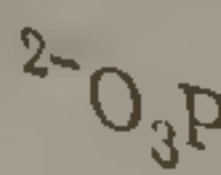
Скорость реакции окисления изучалась в присутствии фиксированных количеств каждого из компонентов реакции (фермент, изоцитрат, НАД, АМФ и  $Mg^{2+}$ ) при переменном объеме растворителя. Концентрации субстрата и эффекторов во всех случаях были далеки от насыщающих.

ассоциацией полипептидных субъединиц изоцитратдегидрогеназы в зависимости от концентрации аллостерического эффектора. Однако если бы в этом состоял молекулярный механизм регуляторных воздействий, то следовало бы ожидать, что скорость катализируемой ферментом реакции будет зависеть также от более высокой степени ( $> 1$ ) концентрации фермента, поскольку ассоциация субъединиц — процесс бимолекулярный или

Ферментативная реакция более высокого порядка явно не так: при изменении концентрации субстрата и эффекторов от первой степени тально, каков бы ни был путь изменения, фермент должен оставаться активным. Отрицательные эффекты в ферментных системах, и лазы (см. следующие главы).

Когда концентрация субстрата или эффектора становится максимальной, скорость реакции не зависит от дальнейшего изменения концентраций субстрата и эффекторов. Это наглядно показано на графике зависимости скорости реакции от концентрации субстрата при фиксированных концентрациях эффекторов с различным количеством фермента. Что в этих условиях наблюдается двенадцатой степенной зависимости.

Аспартаттрансаминаза — фермент, катализирующий реакцию:



Карбонил

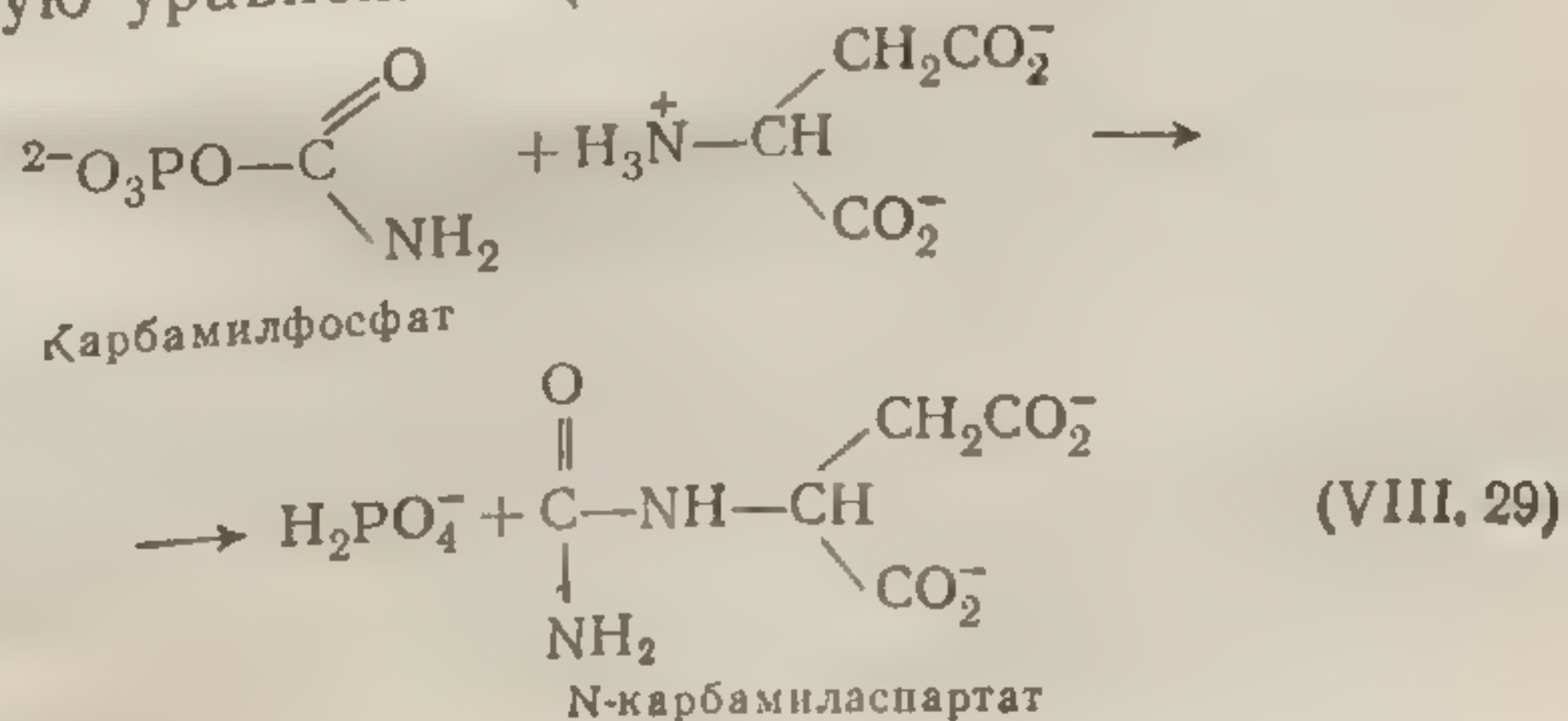


более высокого порядка. Между тем в действительности это явно не так; при фиксированных уровнях концентраций субстрата и эффекторов скорость реакции зависит от первой степени концентрации фермента. Следовательно, каков бы ни был детальный механизм регуляции путем изменения конформации субъединиц, составляющих ферментный комплекс, сами субъединицы должны оставаться ассоциированными. В случае изоцитратдегидрогеназы все известные эффекторы *увеличивают* скорость реакции при низких концентрациях субстрата (т. е. являются *положительными* эффекторами). *Отрицательные* эффекторы известны для других ферментных систем, например для аспартаттранскарбамилазы (см. следующий раздел).

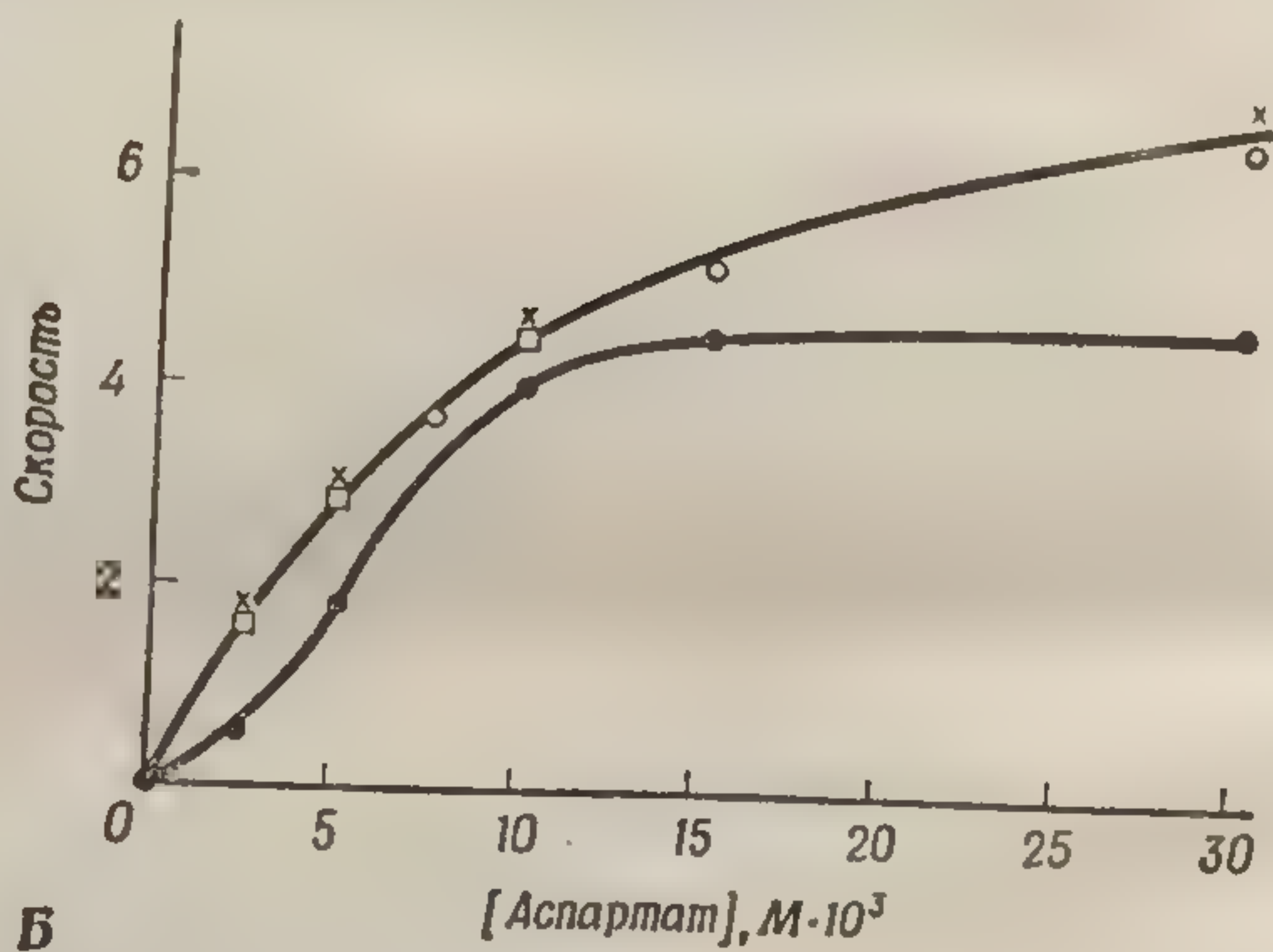
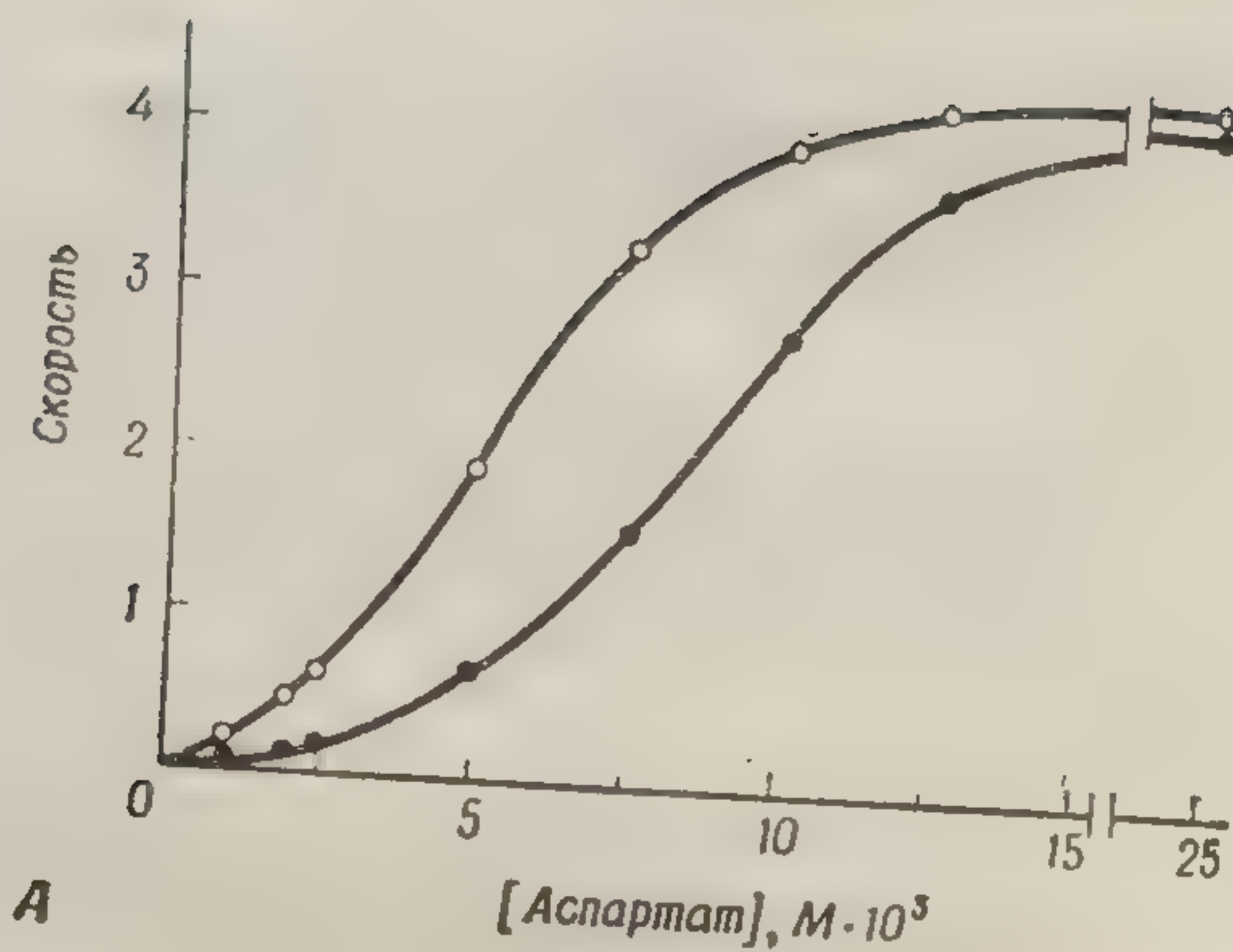
Когда концентрация субстрата настолько низка, что скорость реакции составляет лишь несколько процентов максимально возможной величины, чувствительность реакции к изменениям концентраций аллостерических субстратов и эффекторов оказывается наибольшей, как это наглядно показано на фиг. 110. Одновременное влияние концентраций изоцитрата, НАД<sup>+</sup>, АМФ, Mg<sup>2+</sup> и фермента на скорость реакции изучалось путем смешивания фиксированных количеств фермента, субстратов и эффекторов с различными объемами растворителя. Оказалось, что в этих условиях скорость реакции пропорциональна *одиннадцатой* степени общей концентрации растворенных веществ.

#### Аспартаттранскарбамилаза

Аспартаттранскарбамилаза катализирует реакцию, описываемую уравнением (VIII.29).







Фиг. 111. Зависимость скорости реакции от концентрации аспарагиновой кислоты для аспартаттранскарбамилазы при pH 7,0 и различных условиях опыта (J. C. Gerhart and A. B. Pardee, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 491, 1963).

А. Нативный олигомерный фермент в присутствии (●) и в отсутствие (○) отрицательного эффектора ЦТФ (концентрация ЦТФ  $2 \cdot 10^{-4}$  М). Б. Нативный (необработанный) фермент (●); нативный фермент в присутствии  $10^{-6}$  М  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  (×); после прогрева нативного фермента при  $60^\circ$  в течение 4 мин (○); прогретый фермент в присутствии  $2 \cdot 10^{-4}$  М ЦТФ (□).

Метаболические процессы в клетке происходят в три этапа: 1) задержка в полипептиде, 2) в другие аминокислоты и 3) бис-кислоты (пиримидины) в N-карбонате первой стадии к синтезу пиримидина ингибируется. Они полагают, что такое соотношение скорости синтеза более высоких каталитического ЦТФ синтез фермент аспартаттранскарбамилазы в отношении ферментативной активности от концентрации ЦТФ. Фиг. 111. Отметим, что ЦТФ является ингибитором системы изоцитрат-аспартат. Этим объясняется наблюдение, что в зависимости от концентрации эффектора АМН изоцитрат не превращается в аспартат. Аспартат практически чистый молекулярный (по молекулярной массе) диффузионный процесс, влияющий на комплексы с другими соединениями. Свои свойства реакции от концентрации ЦТФ как это предположительно не зависит от фермента.

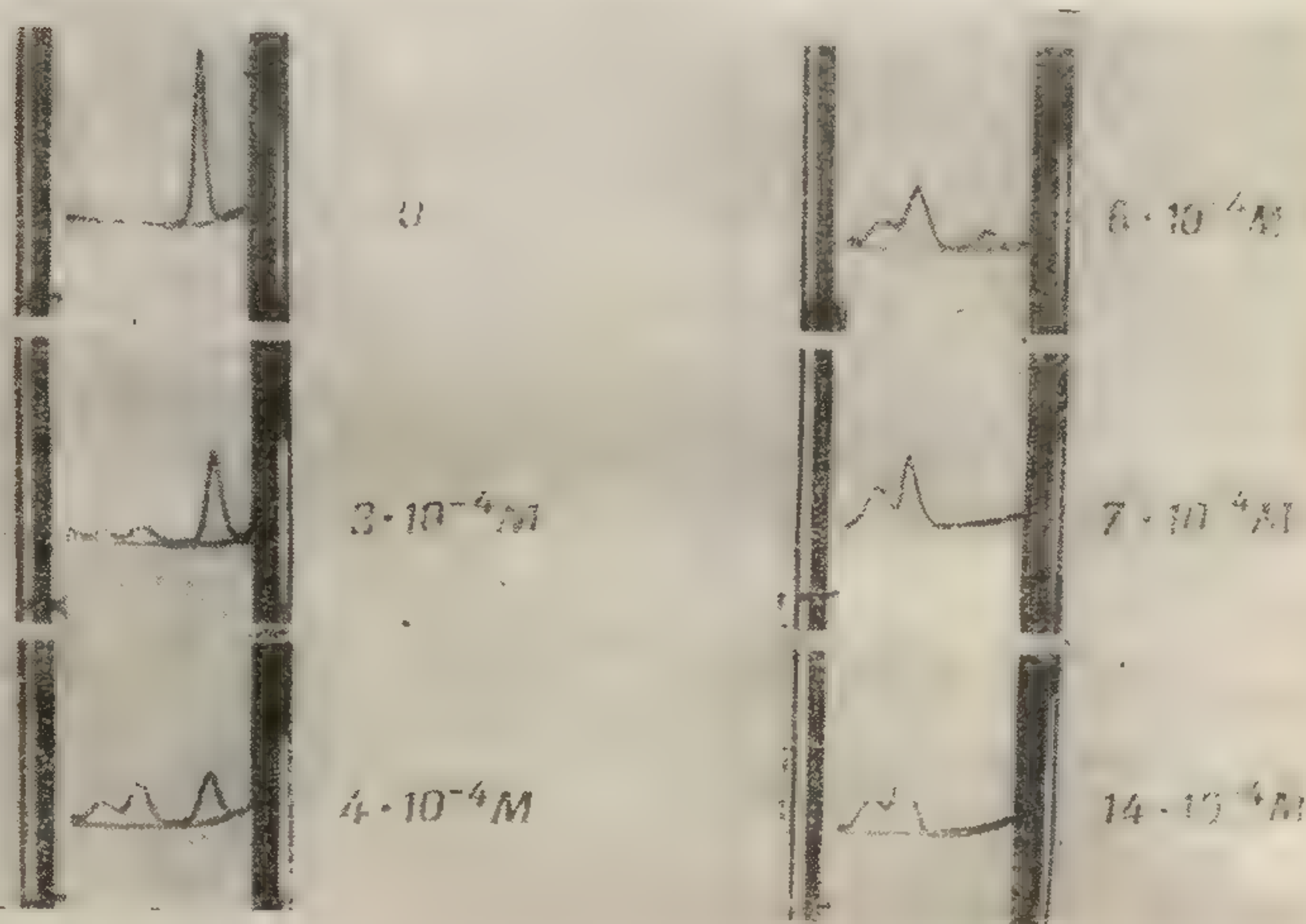


Метаболическую судьбу аспарагиновой кислоты определяют три различные ферментативные цепи реакций, а именно: 1) завершающее включение этой аминокислоты в полипептиды, 2) превращение аспарагиновой кислоты в другие аминокислоты в процессах клеточного метаболизма и 3) биосинтез предшественников нуклеиновых кислот (пиримидинов). Превращение аспарагиновой кислоты в N-карбамиласпартат [уравнение (VIII.29)] является первой стадией на метаболическом пути, ведущем к синтезу пиримидинов. Эта ферментативная реакция ингибируется последним продуктом на пути биосинтеза пиримидинов — цитидинтрифосфатом (ЦТФ). Полагают, что такое ингибирование важно для регуляции скорости синтеза пиримидинов, так как под влиянием более высоких концентраций пиримидинового производного ЦТФ синтез тормозится. ЦТФ-чувствительный фермент аспартаттранскарбамилаза ведет себя в кинетическом отношении так, как это свойственно аллостерическим ферментным системам. Зависимость скорости реакции от концентраций аспартата и ЦТФ изображена на фиг. 111. Отметим, что в этом случае отрицательный эффектор (ЦТФ) увеличивает кооперативность по субстрату. Этим рассматриваемая система отличается от системы изоцитратдегидрогеназа — АМФ, в которой не наблюдается никакого изменения степени кооперативности в зависимости от концентрации положительного эффектора АМФ (т. е. кажущийся порядок реакции по изоцитрату не изменяется).

Аспартаттранскарбамилаза может быть получена в практически чистом виде. В водном растворе кажущийся молекулярный вес этого белка равен приблизительно 300 000 (по гидродинамическим, седиментационным и диффузионным параметрам). На ферментативный катализ влияет добавление соединений ртути (образующих комплексы с сульфгидрильными группами). В присутствии соединений ртути все кооперативные (аллостерические) свойства утрачиваются; зависимость скорости реакции от концентрации субстрата становится такой, как это предписывается моделью Михаэлиса—Ментен, и на нее не влияет присутствие ЦТФ. Когда препараты фермента, обработанные *n*-оксимерикурбензоатом,



исследуют в ультрацентрифуге (фиг. 112), в них, помимо исходного белка, обнаруживается два новых белковых компонента с меньшим молекулярным весом. Эти новые компоненты можно разделить и удалить из них ртутное

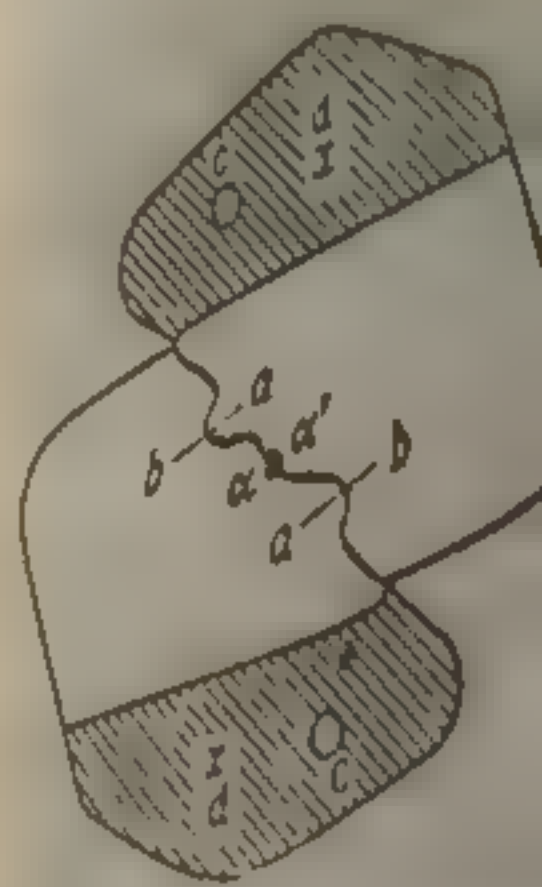


Фиг. 112. Диссоциация аспартаттранскарбамилазы под действием соединений ртути при pH 7,0 и различных концентрациях *p*-хлор-меркурбензоата (пХМБ) (J. C. Gerhart and H. K. Schachman, Biochemistry, 4, 1054, 1965).

Седиментограммы приведены для ультрацентрифугирования на скорости 60 000 об/мин через 40 мин после обработки ртутным соединением. Движение пиков слева направо. Обратите внимание на появление возрастающих количеств более легких белков с увеличением концентрации пХМБ.

соединение посредством диализа. Полученный таким путем компонент с большим молекулярным весом обладает каталитической активностью. Когда зависимость скорости реакции от концентрации субстрата изучают в системе, где роль катализатора играет этот компонент, кооперативность, отмеченная на фиг. 111, исчезает и график зависимости скорости от концентрации приобретает вид, предсказываемый моделью Михаэлиса—Ментен (независимые центры). Кроме того, ЦТФ, прежде

Фиг. 113. Схематическое изображение действия ртутного соединения на скорость реакции каталитической. Ртутное соединение связывается с активными центрами, что приводит к снижению скорости реакции.



А

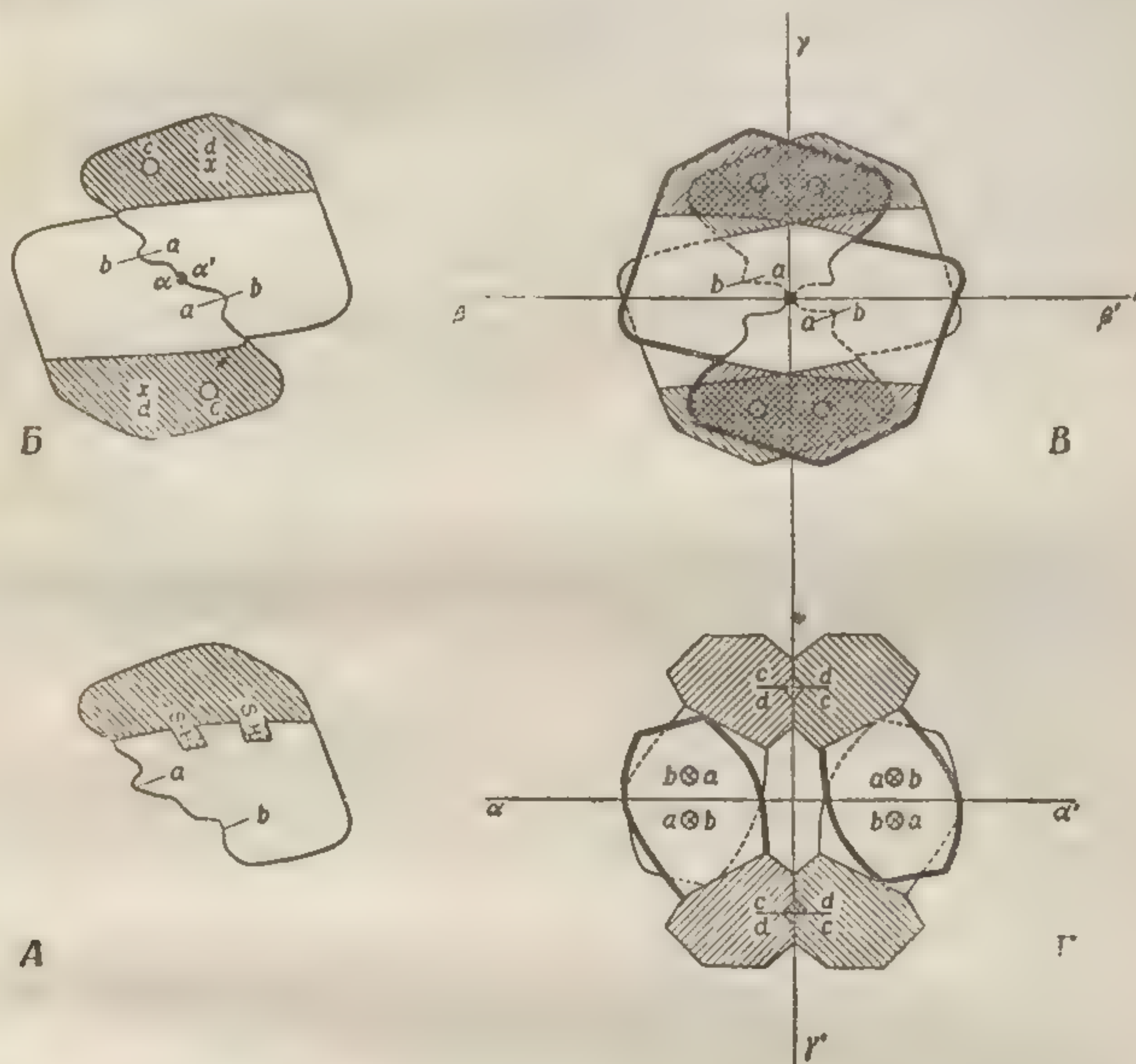
Фиг. 113. Схематическое изображение действия ртутного соединения на скорость реакции каталитической.

структура. Протомер. Заштатирован, незащитен. Выделенной кагалли. Связаны по типу сульфидильные. В. Изологические. Неиндифференцирующая в результате регуляторные. Поворот молекулы. Ладаст тремя.

растворе, со. белковый кс. прочно связ.



действовавший как ингибитор, теперь уже не влияет на скорость реакции. Компонент с более низким молекулярным весом каталитически инертен. Показано, что в



Фиг. 113. Схематическое изображение предполагаемой олигомерной структуры аспартаттранскарбамилазы из *E. coli*.

А. Протомер. Заштрихованная область представляет регуляторную часть протомера, незаштрихованная — его каталитическую часть, состоящую из половины выделенной каталитической субъединицы. Регуляторные и каталитические части связаны по типу гетерологической ассоциации (H), в которой играют роль сульфгидрильные группы, принадлежащие исключительно регуляторной половине. Б. Изологическая ассоциация (IC) двух протомеров через их каталитические половинки. Получающийся димер обладает осью симметрии второго порядка  $\alpha - \alpha'$ , перпендикулярной плоскости рисунка. В. Тетрамерная молекула, возникающая в результате изологической ассоциации (IR) двух таких димеров через их регуляторные половинки. Г. Тот же тетрамер в другой проекции, после поворота молекулы на  $90^\circ$  вокруг оси  $\gamma - \gamma'$  по часовой стрелке. Тетрамер обладает тремя осями симметрии второго порядка:  $\alpha - \alpha'$ ,  $\beta - \beta'$  и  $\gamma - \gamma'$ .

растворе, содержащем только этот низкомолекулярный белковый компонент и ЦТФ, последний специфично и прочно связывается с белком.







рой и функцией ферментов. Однако и на основании уже имеющихся данных можно отметить некоторые общие характерные черты изученных структур:

1. У каждого из исследованных ферментов полипептидная цепь свернута в компактную структуру, форма которой приближается к сферической.

2. В молекуле каждого фермента (речь идет о нативной конформации) имеется отчетливо выраженная полость, или щель. Эта полость образована, по крайней мере частично, теми отрезками полипептидной цепи, которые участвуют в связывании субстрата и в каталитическом акте.

3. В отличие от миоглобина и гемоглобина лишь небольшая доля полипептидной цепи исследованных ферментов находится в  $\alpha$ -спиральной конфигурации.

Всем ли ферментам присущи перечисленные особенности, это покажут будущие исследования. В двух следующих разделах мы рассмотрим подробнее структуру карбоангидразы и лизоцима.

### Карбоангидраза

Карбоангидраза катализирует следующую реакцию:

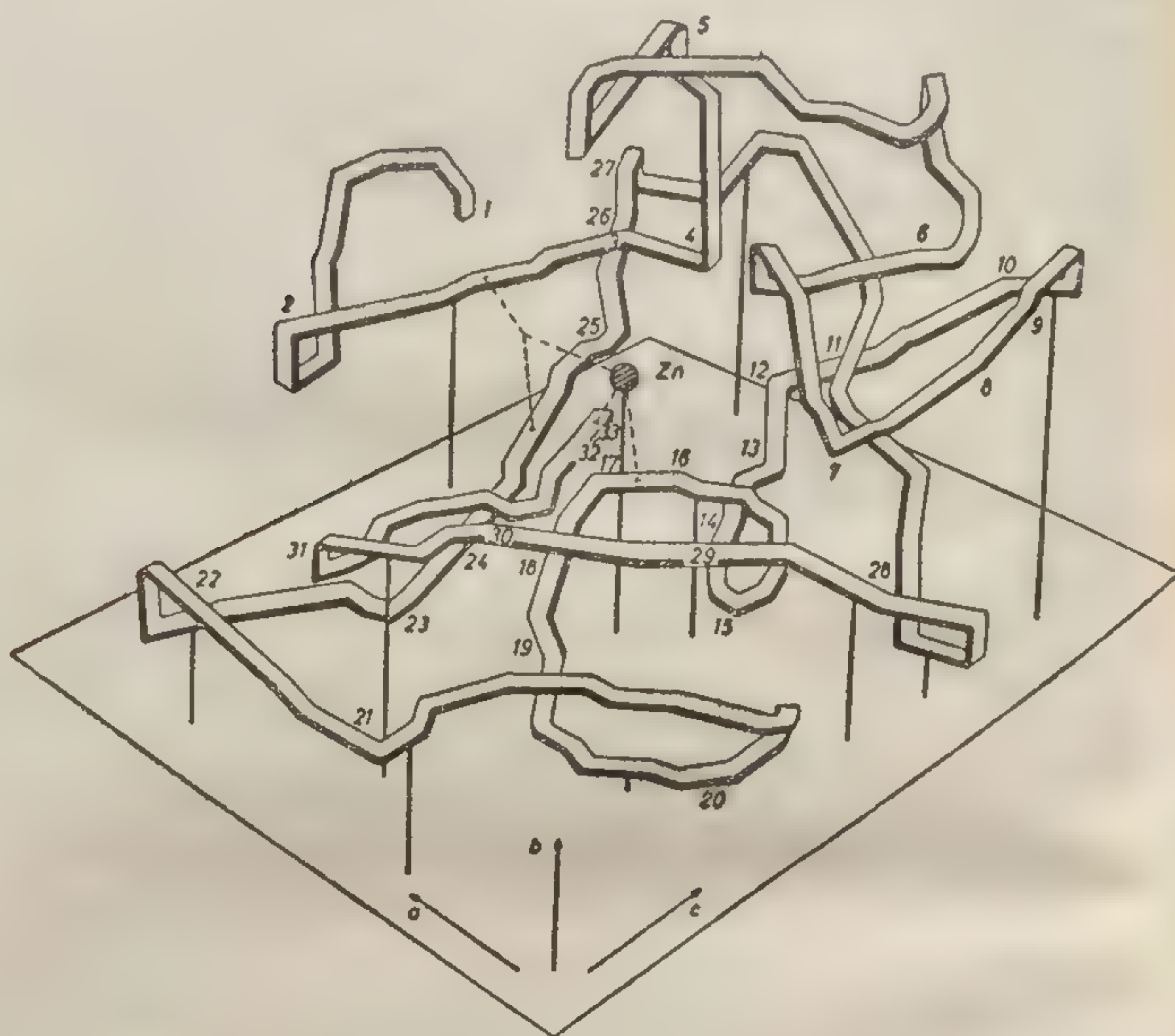


Дегидратация угольной кислоты протекает в нейтральной зоне pH относительно медленно, и, для того чтобы скорость этой реакции отвечала физиологическим потребностям, необходим ферментативный катализ. Молекула нативной карбоангидразы (мол. вес  $\sim 3 \cdot 10^4$ ) содержит один атом Zn, необходимый для сохранения ферментативной активности. Наличие этого атома металла в молекуле фермента облегчает кристаллографические исследования. Высокая электронная плотность атома Zn, расположенного в области активного центра, позволяет определить его положение в молекуле фермента. На фиг. 114 представлена конформация полипептидной цепи карбоангидразы и указано положение атома Zn по данным рентгеноструктурных исследований. Более детальная картина области активного центра (при разрешении 5 Å) показана на фиг. 115. На этой схеме видна полость,



в которой находится активный центр и расположенный в нем атом Zn.

Атом Zn прочно связан в активном центре, по-видимому, в результате образования комплекса с боковыми



Ф и г. 114. Строение карбоангидразы при разрешении 5 Å.

цепями определенных аминокислот. Известно, что цинк образует тетраэдрические комплексы. Имеющиеся данные о структуре активного центра позволяют считать, что три из четырех лигандов атома Zn представлены боковыми цепями полипептидной цепи. Связь, которая должна быть занята четвертым лигандом (она направлена от атома Zn в сторону полости), остается незамещенной. По-видимому, четвертым лигандом служит присоединяющийся к ферменту субстрат.





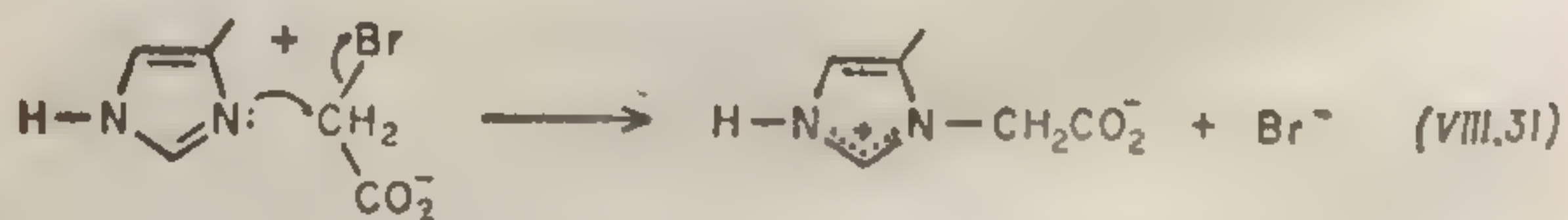
Ф и г. 115. Область цинксодержащего активного центра карбоангидразы.



Структура активного центра представлена на фиг. 115 при разрешении 5 Å. При таком разрешении отдельные атомы не различимы, но изгибы и повороты полипептидной цепи могут быть прослежены на всем ее протяжении. Если известна последовательность аминокислотных остатков, то можно сделать заключения о положении ряда атомов на основании имеющихся данных о конфигурации боковых цепей некоторых более крупных аминокислот.

Интересным результатом при исследовании структуры карбоангидразы было обнаружение участия концевой ионизированной карбоксильной группы в формировании активного центра (эта группа является одним из лигандов атома цинка). Любопытно сопоставить эти данные с результатами, полученными при исследовании химотрипсина и трипсина (разд. 1 данной главы), а также рибонуклеазы (разд. 2); и в этих случаях концевые аминокислотные остатки оказались существенными для ферментативного действия. Напомним в связи с этим, что до сих пор не удавалось отщепить от какого-либо фермента относительно небольшой пептидный фрагмент, который сохранял бы ферментативную активность.

Карбоангидраза быстро и стехиометрически инактивируется анионом бромацетата. Установлено, что в ингибированном ферменте алкилирован один из остатков гистидина:



Опыты по химическому модифицированию фермента позволили также сделать вывод о том, что в каталитическом процессе участвует один остаток метионина и концевая карбоксильная группа.

Число оборотов карбоангидразы в реакции дегидратации угольной кислоты необычно велико ( $\sim 6 \cdot 10^5 \text{ сек}^{-1}$ ).

Формула:  $\text{H}_2\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{C}(\text{OH})_2$   
Показ ингибирования  
измеряют гидратации

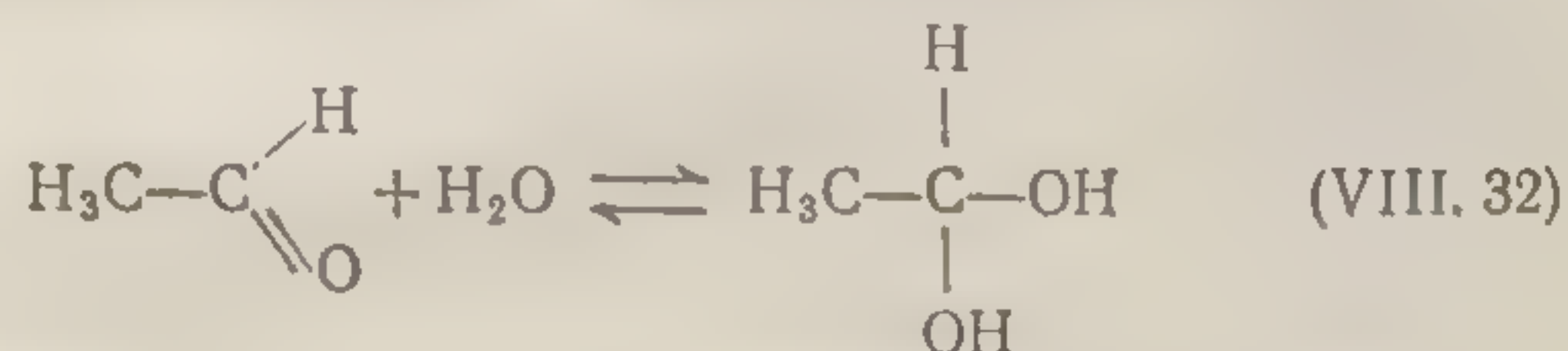
Обе эти реакции, в  
фильными реагентами  
выступает в роли  
1 гл. VI).

Лизоцим яичного  
рого была установлена  
уровне атомного  
бина, знание ами  
гло выяснить по  
тура лизоцима  
лизоцима состо  
жащей 129 ами  
стики образуют

Точное пред  
вой молекулы  
известной амин  
щее время неос  
логграфическим  
уверенности а  
кислотной пос  
бой разумеетс  
легче, если «пр  
мы знаем, чт  
венно начать  
даться внутри  
с линейной п  
куле лизоцима  
рофильные бо  
но, а обнаруж  
тельно больш  
первых 39 ам  
цевой аминок



Помимо гидратации двуокиси углерода, фермент катализует гидратацию уксусного альдегида



Обе эти реакции, как известно, катализируются электрофильными реагентами. Можно полагать, что атом Zn выступает в роли электрофильного катализатора (разд. I гл. VI).

### Лизоцим яичного белка

Лизоцим яичного белка — первый фермент, для которого была установлена полная трехмерная структура на уровне атомного разрешения. Как и в случае миоглобина, знание аминокислотной последовательности помогло выяснить полную структуру белка. Первичная структура лизоцима представлена на фиг. 116. Молекула лизоцима состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 129 аминокислотных остатков; дисульфидные мостики образуют четыре поперечные связи.

Точное предсказание характера свертывания белковой молекулы в ее нативной конформации на основании известной аминокислотной последовательности в настоящее время неосуществимо. Однако, располагая кристаллографическими данными, можно с определенной долей уверенности анализировать зависимость между аминокислотной последовательностью и структурой (само собой разумеется, что делать предсказания значительно легче, если «предсказываемое» уже известно). Поскольку мы знаем, что полипептидная цепь свернута, естественно начать с вопроса, какая часть цепи должна находиться внутри, а какая — снаружи. При ознакомлении с линейной последовательностью аминокислот в молекуле лизоцима легко заметить, что гидрофобные и гидрофильные боковые цепи распределяются не бессистемно, а обнаруживают тенденцию к образованию относительно больших скоплений. Так, значительную часть первых 39 аминокислотных остатков (начиная с N-концевой аминокислоты) составляют гидрофобные остатки;





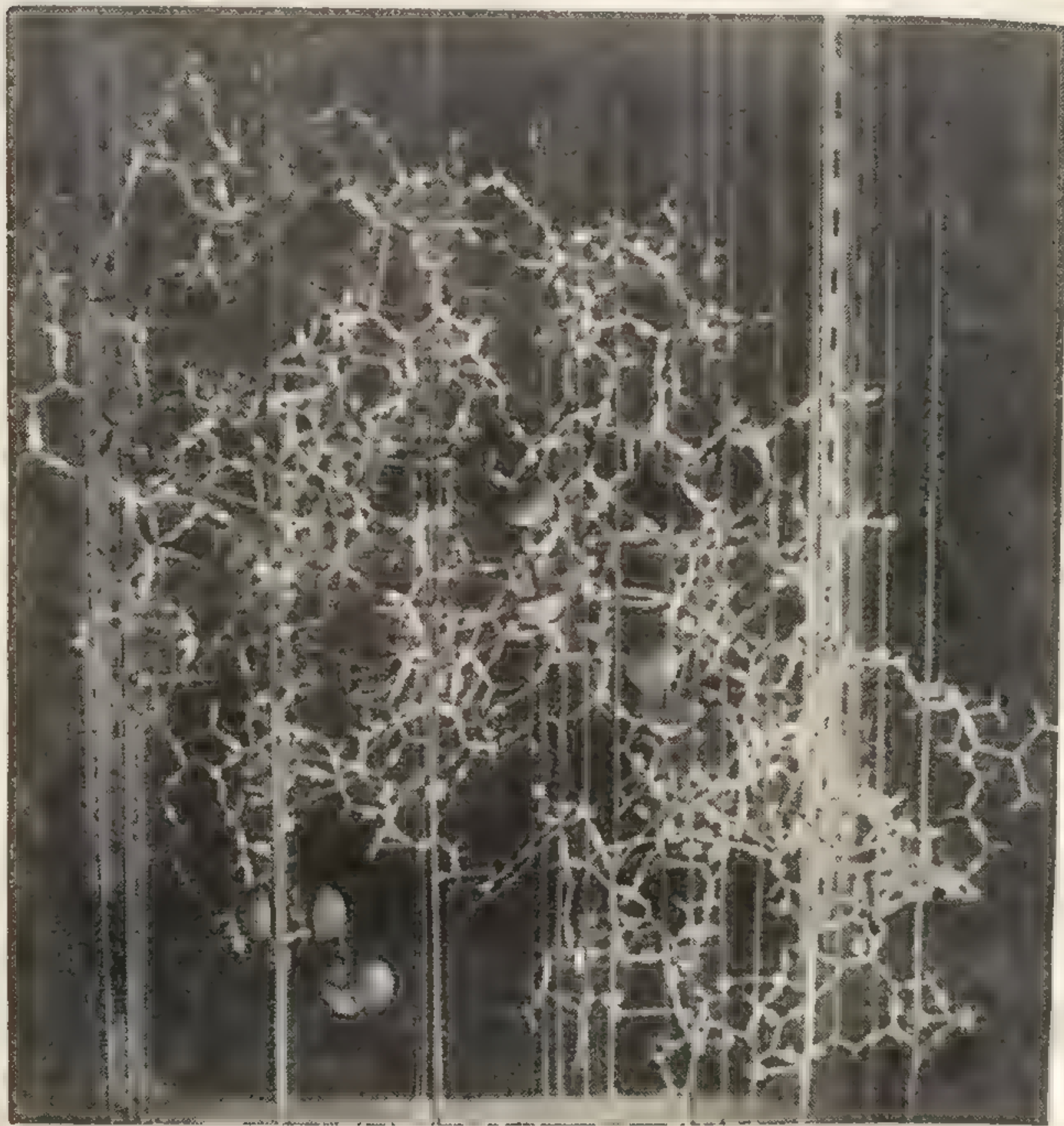


среди следующих 40 остатков преобладают гидрофильные, а последняя (С-концевая) треть полипептидной цепи состоит опять-таки по преимуществу из гидрофобных остатков. Лишь небольшое число участков полипептидной цепи способно образовать сколько-нибудь протяженную  $\alpha$ -спиральную структуру; это участки, включающие аминокислотные остатки 5—15, 24—34 и 88—96 (разд. 3 гл. III). Напомним, что стабильная  $\alpha$ -спиральная структура должна охватывать не менее семи аминокислотных остатков, для того чтобы центральный аминокислотный остаток мог образовать по крайней мере две водородные связи.

На фиг. 117 изображена проволочная модель молекулы лизоцима яичного белка, дающая представление о конформации полипептидного остова молекулы. Эта модель построена на основании карт распределения электронной плотности при разрешении 2Å. Такое разрешение позволяет значительно полнее и более определенно охарактеризовать форму молекулы, чем это показано на приведенной здесь модели; однако оно все же недостаточно для того, чтобы локализовать отдельные атомы. Распознавание боковых цепей аминокислот и их конфигурации осуществляется путем комбинирования рентгеноструктурных данных и сведений о последовательности аминокислотных остатков в полипептидной цепи лизоцима. Таким образом, при помощи рентгеноструктурного анализа с относительно небольшим разрешением удастся распознать уже известные конфигурации боковых цепей аминокислот. На основании подобных комбинированных данных была построена трехмерная молекулярная модель лизоцима, в которой достаточно надежно показаны положения почти всех атомов в молекуле этого фермента. Какие заключения можно сделать при рассмотрении подобной модели? Отметим прежде всего, что весьма нелегко построить трехмерную модель, отражающую положение столь большого числа атомов. (Для рассмотренной выше структуры карбоангидразы с разрешением 5Å эта задача гораздо проще, так как в ней отсутствуют данные о положении отдельных атомов.) Наиболее очевидной характерной особенностью модели лизоцима является наличие одиночной щели, в которой,



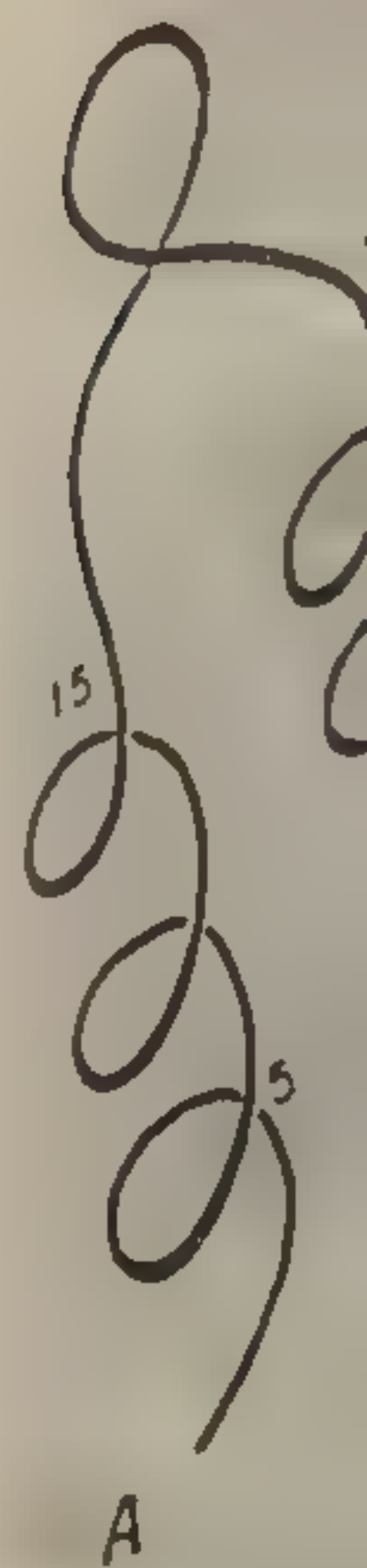
по-видимому, расположен участок связывания субстрата. Каким образом может образоваться такая щель при свертывании полипептида?



Фиг. 117. Каркасная модель конформации полипептидной цепи лизоцима яичного белка.

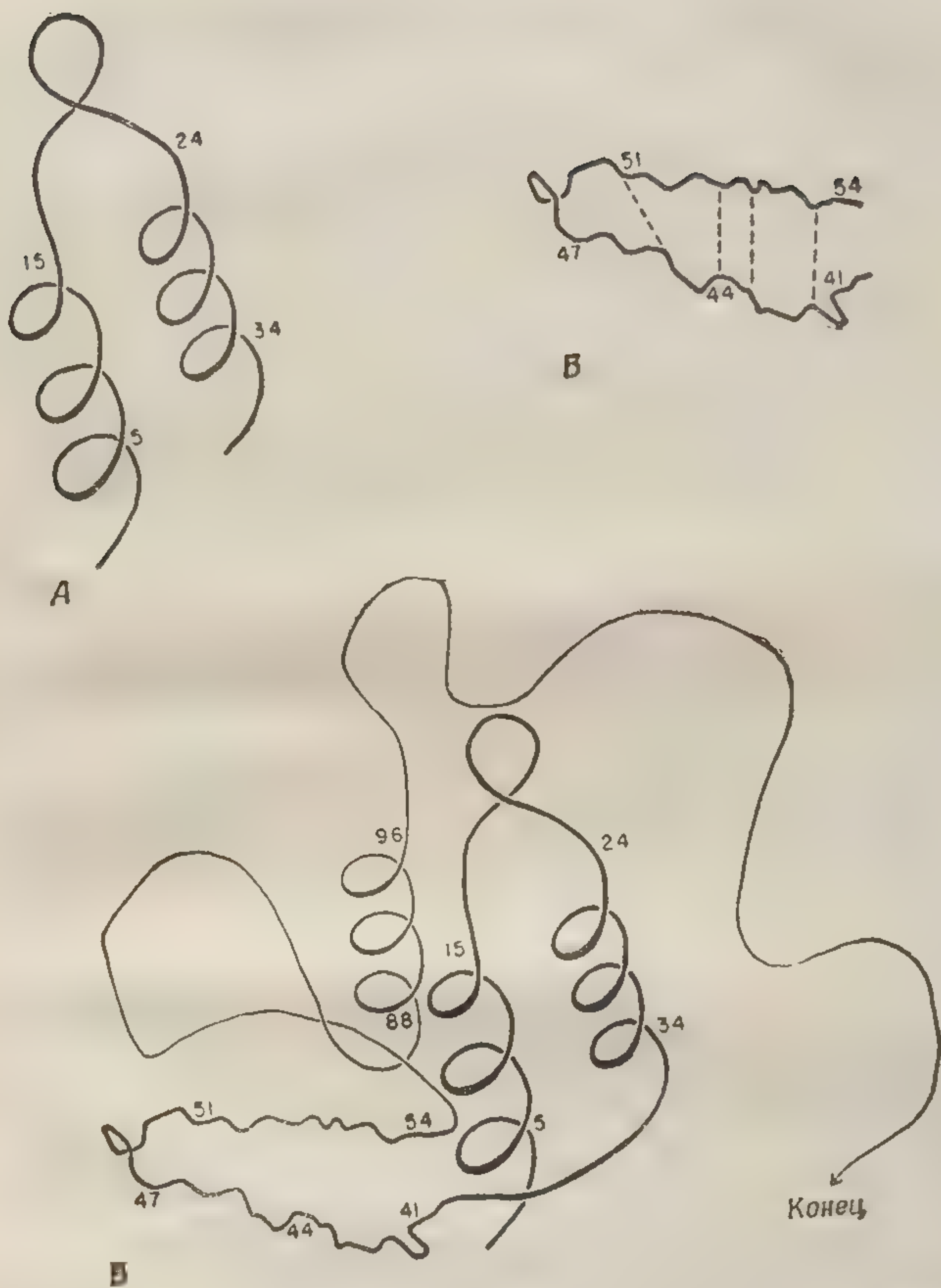
В настоящее время имеются убедительные данные о том, что биосинтез белка начинается с аминного конца полипептидной цепи<sup>1</sup>. Есть также достаточно оснований считать, что полипептидная цепь свертывается по мере того, как она синтезируется. В полипептидной цепи

<sup>1</sup> См., например, Ингрэм В., Биосинтез макромолекул, изд-во «Мир», М., 1966.



Фиг. 118. участвующие в свертывании. А. Два отрезка складчатая взаимодействия.





Фиг. 118. Структурные компоненты полипептидной цепи лизоцима, участвующие в образовании щели в области активного центра.

А. Два отрезка  $\alpha$ -спирали вблизи N-конца полипептида. Б. Антипараллельная складчатая структура. В. Третий спирализованный отрезок (остатки 88—96) взаимодействует с гидрофобным спиральным "крылом" (см. А) и с гидрофильной складчатой структурой (см. Б), образуя щель.

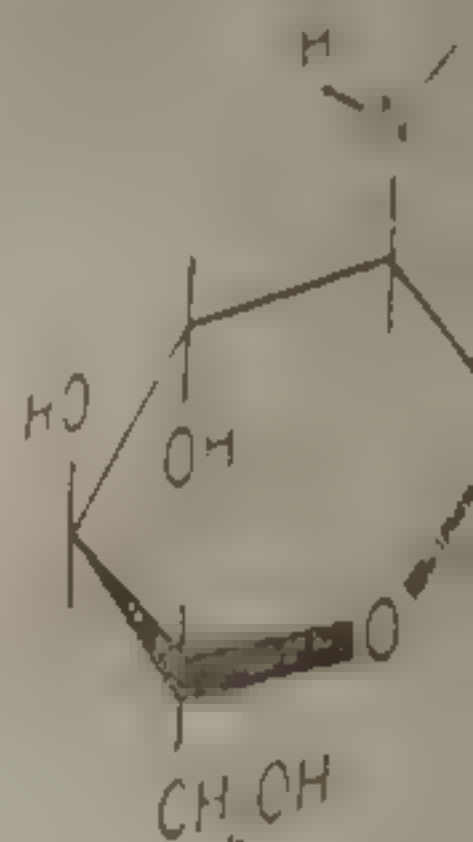


лизоцима 34 аминокислоты, примыкающие к N-концу, образуют два  $\alpha$ -спиральных участка. Первый из них (остатки 5—15) имеет конфигурацию, предсказанную Полингом и Кори, тогда как второй (остатки 24—34) несколько отличается по расположению водородных связей от «нормальной»  $\alpha$ -спирали. Эти два спиральных участка, окруженные в основном гидрофобными боковыми цепями, образуют вместе большую гидрофобную область молекулы (фиг. 118, А). Остатки 35—40 служат связующим звеном с другим типом регулярной полипептидной структуры (также предсказанной ранее Полингом и Кори), а именно с «антипараллельной складчатой структурой»; такую структуру образуют остатки 41—45 и 50—54. Расположение внутримолекулярных водородных связей в структуре этого типа показано на фиг. 118, Б. Связующие остатки (46—49) образуют «головку шпильки», т. е. изгиб, необходимый для того, чтобы между двумя относительно прямыми отрезками полипептидной цепи могли образоваться водородные связи. Остальная часть цепи уложена в основном нерегулярным, но высокоспецифическим образом; однако остатки 88—96 образуют третий спиральный участок.

Гидрофобная стенка — первые 35 аминокислотных остатков — примыкает к остаткам 41—54, образующим гидрофильную стенку, так что получается крыловидная гидрофобная и гидрофильная структура, показанная на фиг. 118, В. К одному из ее «крыльев» примыкает третий спиральный участок (остатки 88—96). В итоге образуется щелевидная полость активного центра. Остаток полипептидной цепи свернут вокруг этой основной структуры сложным образом, причем щель остается доступной для раствора, окружающего молекулу белка. Упаковка молекулы такова, что гидрофобные боковые цепи погружены в глубь структуры, а гидрофильные остатки (в особенности заряженные) обращены в сторону окружающего раствора. Мы видим, таким образом, что многие предсказания, основанные на косвенных наблюдениях, подтвердились после того, как была выяснена трехмерная структура лизоцима.

Высказанные выше соображения позволяли лишь предполагать, что активный центр фермента расположен

Выводы из  
исследования  
XVII и XVIII  
и XIX

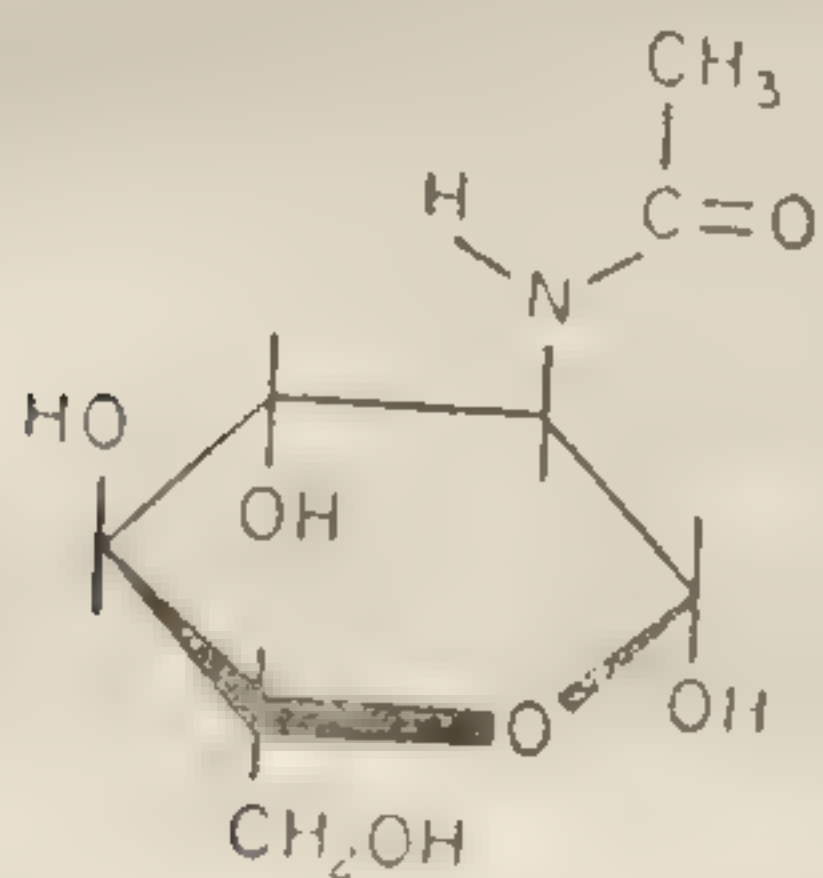


(XVI)

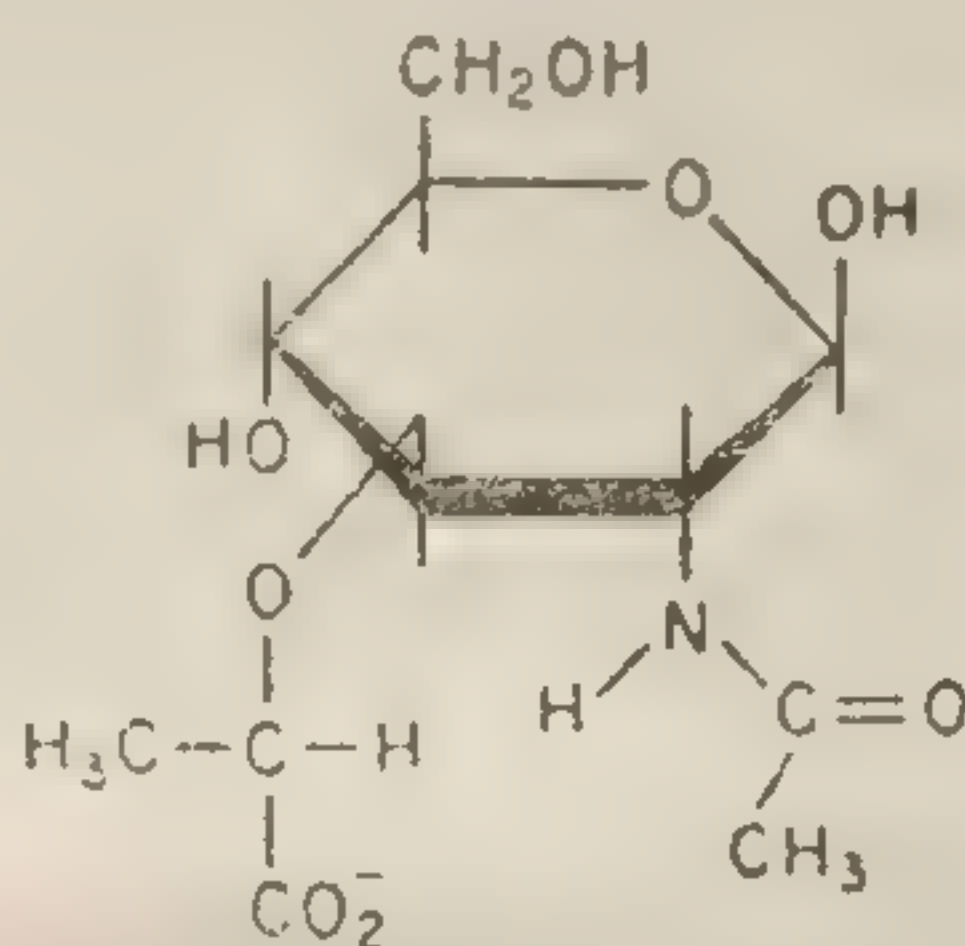
Выяснилось, что атомов в кристалле как это следует из дифракционных исследований интенсивностей зон ингибитора. Показано, что молекулы ингибитора остаются прежними при действии фермента и ферментом и ферментом проведения под действием «разности» структур ингибитора остаются ингибитором координатной локализации фермента. Этим путем ингибитор с области щели. Третья аминокислота находится в остатке



в щелевидной полости. Важным открытием оказалось установление возможности внедрения конкурентных ингибиторов фермента, например N-ацетилглюкозамина (XVI) и N-ацетилмурамовой кислоты (XVII), во влажные кристаллы лизоцима.



(XVI)

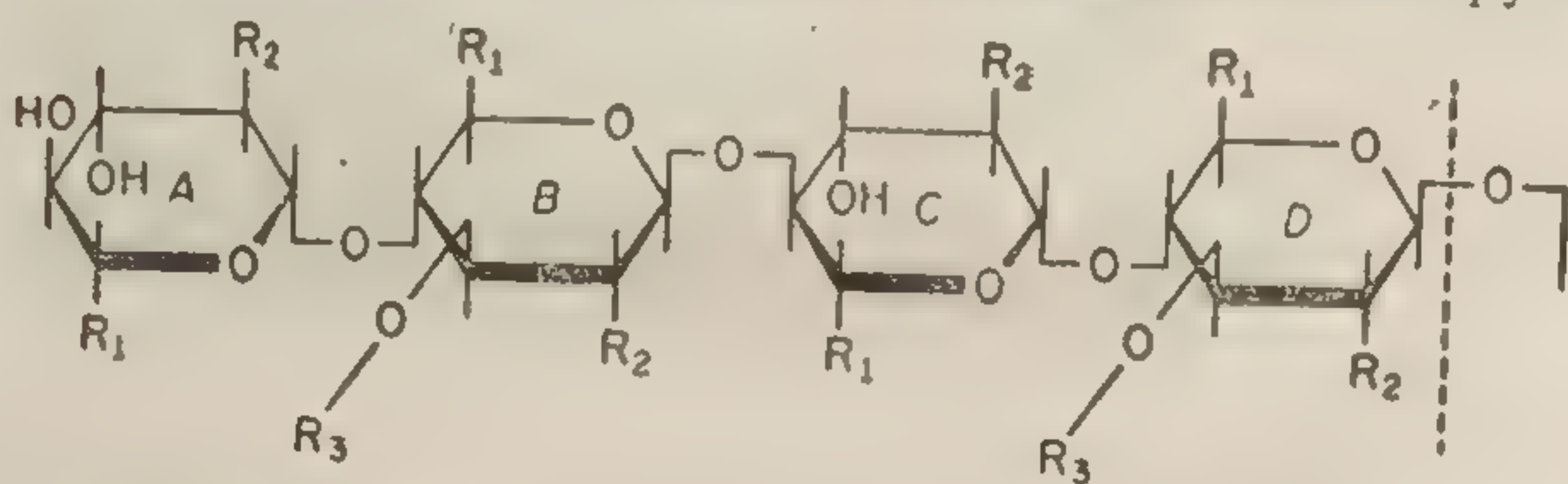


(XVII)

Выяснилось, что при этом подавляющее большинство атомов в кристалле сохраняет свои прежние координаты, как это следует из идентичности *локализации* различных дифракционных максимумов в присутствии и в отсутствие ингибитора. Однако некоторые из относительных *интенсивностей* значительно изменяются при связывании ингибитора. Полагая, что атомные координаты белковой молекулы остаются неизменными (т. е. что фазы остаются прежними), можно с помощью соответствующих методов рассчитать различие в структуре между ферментом и фермент-ингибиторным комплексом. После проведения подобного анализа оказалось, что рассчитанная «разностная структура» совпадает с известной структурой ингибитора; этим подтверждается, что фазы белка остаются практически неизменными в фермент-ингибиторном комплексе. Более того, была определена точная локализация ингибитора в пределах молекулы фермента. Этим путем было установлено, что конкурентный ингибитор связывается с ферментной молекулой в области щели. Такого рода анализ был проведен для ряда аминсахаров, содержащих различное число глюкозидных остатков. Конфигурацию этих соединений —



мономеров, димеров, тримеров и т. д. — можно сопоставить с конфигурацией истинных субстратов фермента. Чем больше глюкозильных остатков конденсируется в надлежащей конфигурации, тем лучшим субстратом для фермента оказывается образующийся олигосахарид (фиг. 119). В случае простого мономера (N-ацетилглюкозамин) наиболее существенным фактором, обуславливающим присоединение ингибитора к ферменту, является образование водородной связи между HN-ацетильной группой и кислородом  $\beta$ -карбоксильной группы

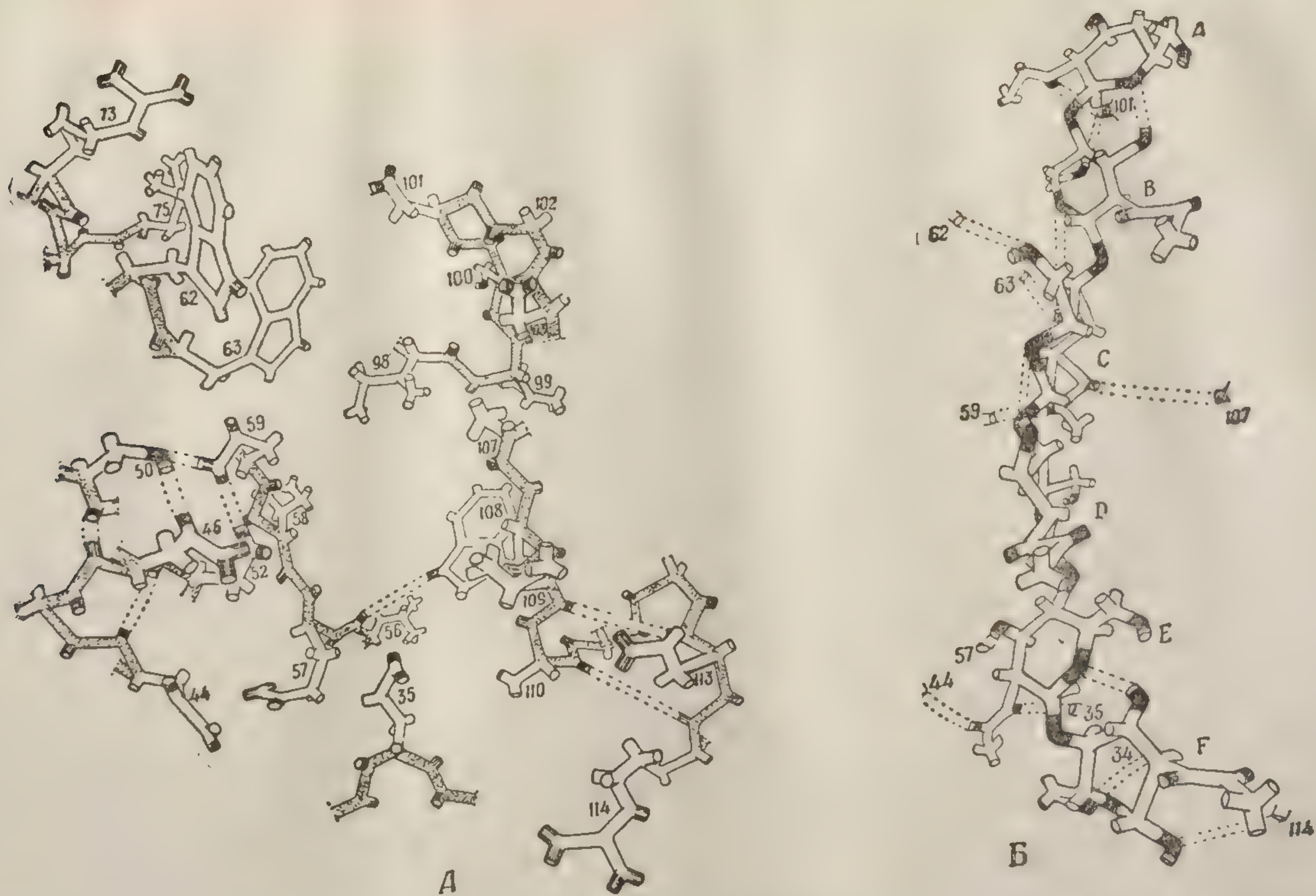


Фиг. 119. Полисахаридный субстрат лизоцима яичного белка.

остатка аспарагиновой кислоты (остаток 101). Эта водородная связь между первой ацетилированной аминогруппой и белком имеет, по-видимому, решающее значение, так как она обнаруживается и при связывании всех более длинных олигомеров (которые глубже проникают в щель). Скорость расщепления олигомеров N-ацетилглюкозамина или же олигомеров, в которых чередуются остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты (фиг. 119), скачкообразно возрастает при переходе к олигомерам, содержащим пять или более глюкозильных остатков (расщепление происходит по связи между кольцами D и E; фиг. 119). Оценка размеров щели показывает, что в ней могут разместиться самое большее шесть мономерных единиц (фиг. 120). Это, вероятно, верхний предел субстратной специфичности активного центра.

Если связывание субстрата происходит так, как это вытекает из фиг. 120, а олигосахаридная цепочка расщепляется между кольцами D и E, то следует тщательно рассмотреть область, окружающую D—E-связь, чтобы



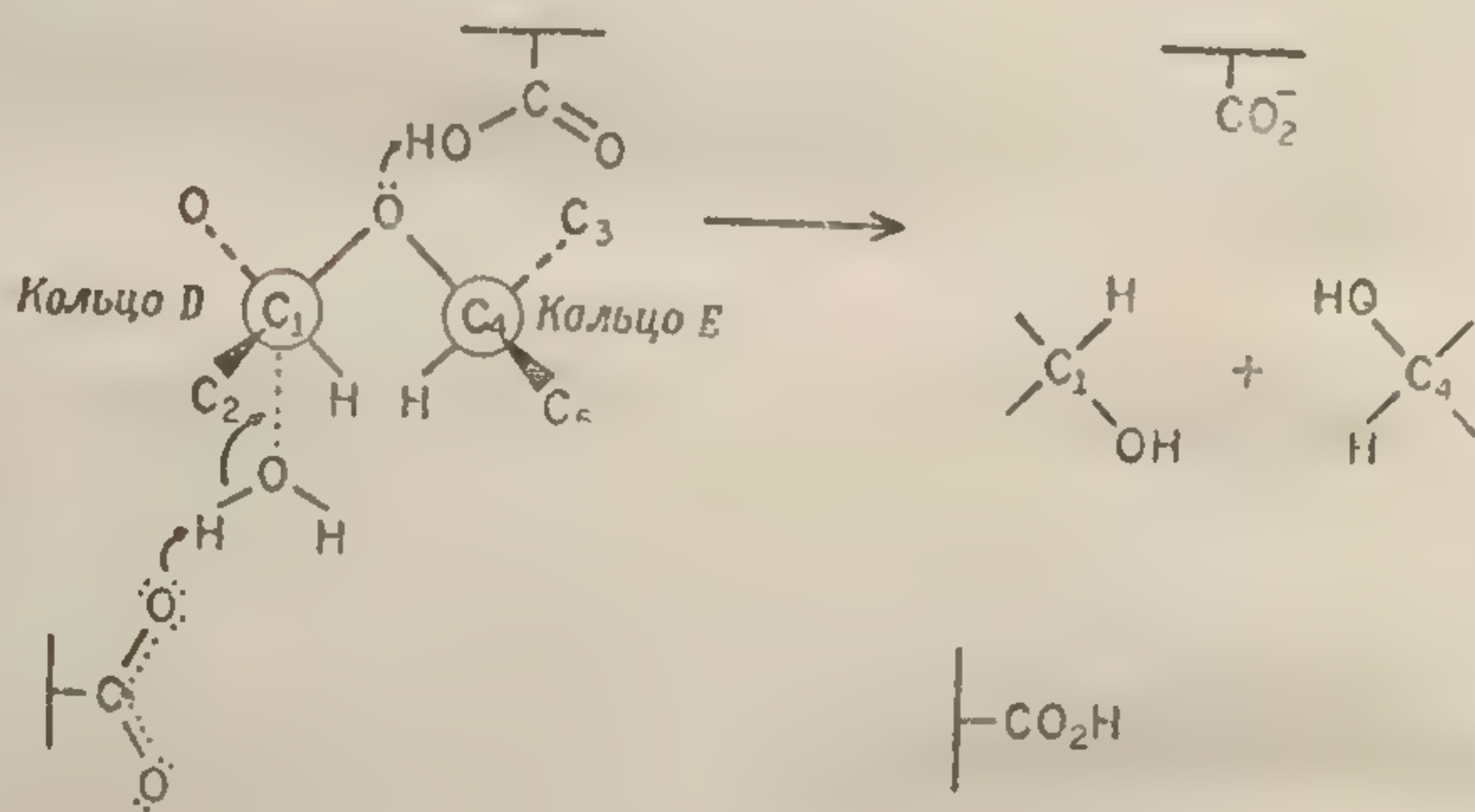


Ф и г. 120. Комплементарные структурные взаимоотношения (на уровне атомных размеров) между субстратом (Б) и активным центром (А) лизоцима.

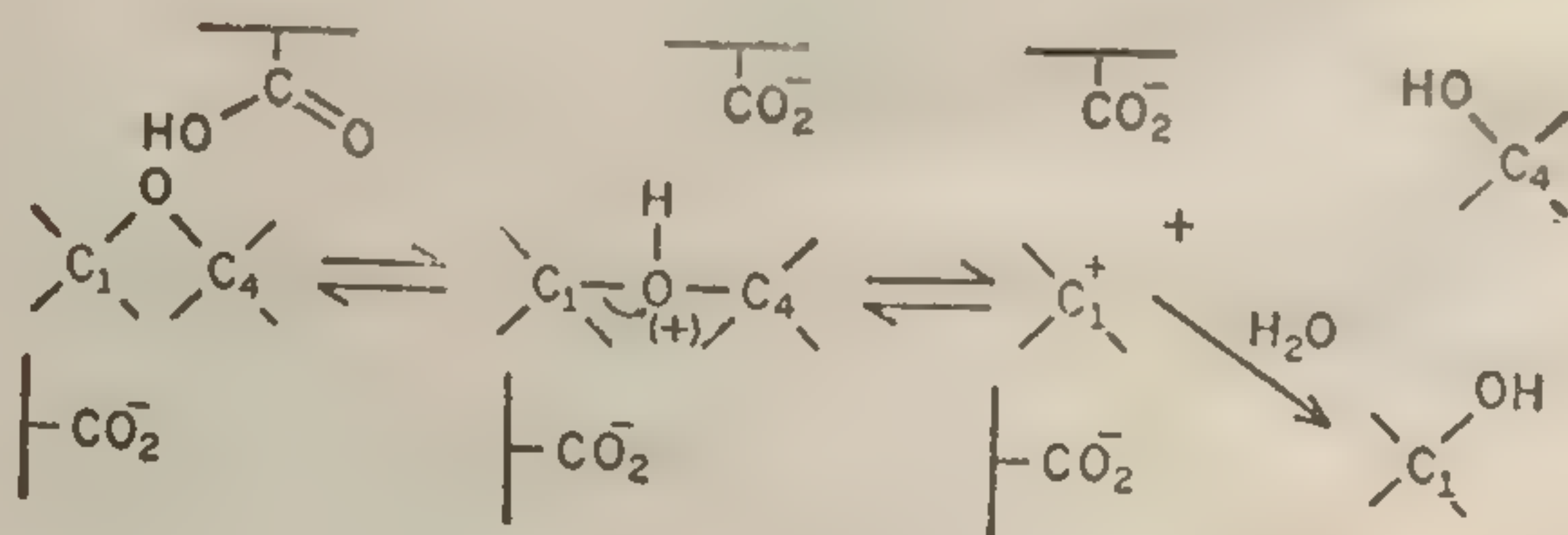


установить, какие в ней есть потенциальные каталитические группы. Очевидно, здесь имеются две такие потенциальные каталитические группы, а именно  $\beta$  и  $\gamma$ -карбоксильные группы соответственно аспарагиновой кислоты (остаток 52) и глутаминовой кислоты (остаток 35). Для механизма действия лизоцима могут быть предложены два альтернативных варианта, оба предусматривающие кислотно-основной катализ одной карбоксильной группой и одним карбоксилатным ионом [уравнение (VIII.33)].

Механизм 1



Механизм 2



(VIII.33)

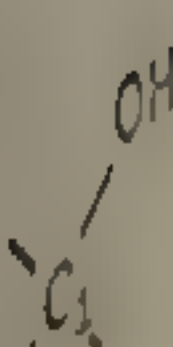
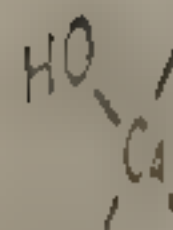
В одном катализ осущ новоя кислот сопряженно молекулы воды облегчает ато ма в положе же остаток общий кист кислородный женного кис углерод (C- (C-1)-карбо ние при обр рование пол зироваться женной кар (остаток 52)

Привед рода пред могут быть ной структ татов ана чение пред реакции, по мере т ферментов их действи механизм щее врем мент-инги сов, т. е. ствие ме цепи, сод остатка ( разовани ний мож случаях нения в м зоциму вает ли



В одном из механизмов общий кислотно-основной катализ осуществляется путем отдачи протона глутаминовой кислотой-35 мостиковому кислороду субстрата; сопряженно происходит акцептирование протона от молекулы воды остатком аспарагиновой кислоты-52, что облегчает атаку гидроксильным ионом углеродного атома в положении 1 кольца D. Во втором механизме тот же остаток глутаминовой кислоты также действует как общий кислотный катализатор, передающий протон на кислородный мостик. Образование положительно заряженного кислородного мостика облегчает разрыв связи углерод (C-1) — кислород, что приводит к образованию (C-1)-карбониевого иона в кольце D. Переходное состояние при образовании этого карбониевого иона (формирование положительного заряда у C-1) должно стабилизироваться в результате близости отрицательно заряженной карбоксильной группы аспарагиновой кислоты (остаток 52).

Приведенные выше рассуждения показывают, какого рода предположения о механизме действия фермента могут быть сделаны на основании данных о его трехмерной структуре. Пожалуй, один из самых важных результатов анализа структуры лизоцима — это именно получение предварительных данных относительно механизма реакции, катализируемой лизоцимом. Несомненно, что по мере того, как будут выясняться структуры других ферментов, выявятся и более тонкие детали механизма их действия. Следует отметить, что постулированные механизмы действия лизоцима основываются *в настоящее время* на кристаллографическом исследовании фермент-ингибиторных (с мономером и тримером) комплексов, т. е. структур, в которых отсутствует взаимодействие между «субстратом» и участком полипептидной цепи, содержащим оба предполагаемых каталитических остатка (Глу-35 и Асп-52). Ранее было отмечено, что образование ковалентных фермент-субстратных соединений может в определенных (а возможно, и во всех) случаях вызывать существенные конформационные изменения в молекуле белка. Между тем присоединение к лизоциму исследованных конкурентных ингибиторов вызывает лишь очень незначительные изменения в конфор-



(17, 33)



мации белка (наиболее заметны небольшие изменения в расположении остатков триптофана). В будущих исследованиях предстоит выяснить, заложены ли все необходимые предпосылки для эффективного биологического катализа в относительно жесткой конформации нативного фермента (о которой свидетельствует идентичность фаз кристаллов лизоцима и лизоцим-ингибиторного комплекса) или же конформационные изменения молекулы фермента сами по себе являются одной из таких предпосылок. Предстоит также выяснить детали молекулярные механизмы ферментативного катализа и сформулировать общие условия для наиболее эффективного катализа в живых системах (если, разумеется, такие условия существуют).

Все, о чем мы говорили на протяжении этих восьми глав, представляет собой (по мнению автора) не более чем предисловие к книге, которая пока еще не написана. Можно, однако, почти не сомневаться в том, что важные недостающие данные относительно связи между структурой и функцией ферментов на молекулярном уровне будут получены в самом ближайшем будущем.

#### ЛИТЕРАТУРА

##### Химотрипсин и родственные ферменты

Bender M. L., The Mechanism of  $\alpha$ -Chymotrypsin Catalyzed Hydrolysis, J. Am. Chem. Soc., 84, 2580 (1962).

Bender M. L., Kezdy F., J. Am. Chem. Soc., 86, 3704 (1964).

##### Первичная структура

Hartley B. S., Amino Acid Sequence of Bovine Chymotrypsinogen A, Nature, 201, 1284 (1964).

Walsh K. A., Neurath H., Trypsinogen and Chymotrypsinogen as Homologous Proteins, Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 52, 884 (1964).

Neurath H., Protein Digesting Enzymes, Scientific American, December 1964.

##### Зависимость активности от pH и каталитический механизм

Oppenheimer H. L., Labouesse B., Hess G. P., J. Biol. Chem., 241, 2720 (1966).

Keizer J., Bernhard S. A., Biochemistry, 5, 4127 (1966).

##### Свойства ацилферментов

Hartley B. S., Kilby B. A., Biochem. J., 56, 288 (1954).

Caplow M., Jencks W. P., Biochemistry, 1, 883 (1962).

Bender M.  
Soc., 84  
Bernhard  
(1965)

Инактивация  
Wilson I.  
Chem.

Быстротеку  
Bernhard  
53, 12

Barman  
Щелочная

Schwartz  
Acid  
Serine  
U. S.

Рибонуклеа

Ферменты

Anfinson  
have

Stein W.  
Scien

Нативная

Richard  
in R

(196

Anfinse  
Natl

Каталитич

Findlay  
Bioc

Ферменты,  
с участием

Общие дан

Snell E.

nel  
hal

Пептид ак

Hughes  
Acad



Bender M. L., Schonbaum G. R., Zerner B., J. Am. Chem. Soc., 84, 2540 (1962).

Bernhard S. A., Lau S. J., Noller H., Biochemistry, 4, 1108 (1965).

*Инактивация необратимыми ингибиторами*

Wilson I. B., Bergmann F., Nachmansohn D., J. Biol. Chem., 186, 781 (1950).

*Быстротекущие реакции со специфическими субстратами*

Bernhard S. A., Gutfreund H., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 53, 1238 (1965).

Barman T. E., Gutfreund H., Ibid., 53, 1243 (1965).

*Щелочная фосфатаза*

Schwartz J. H., Crestfield A. M., Lippman L., The Amino Acid Sequence of a Tetradecapeptide Containing the Reactive Serine in *E. coli* Alkaline Phosphatase, Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 49, 722 (1963).

**Рибонуклеаза**

*Ферментные модели и структура ферментов*

Anfinsen C. B., The Tertiary Structure of Ribonuclease, Brookhaven Symposium in Biology No. 15, p. 184 (1962).

Stein W. H., Moore S. B., The Chemical Structure of Proteins, Scientific American, February 1961.

*Нативная конформация*

Richards F. M., Vithayathil P. J., Peptide-Protein Interactions in RNAase-S, Brookhaven Symposium in Biology No. 13, p. 115 (1960).

Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. H., Jr., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 47, 1309 (1961).

*Каталитический механизм*

Findlay D., Herries D. G., Mathias H. P., Rabin B. R., Biochem. J., 85, 152 (1962).

**Ферменты, катализирующие реакции с участием пиридоксальфосфата**

*Общие данные*

Snell E. E., Fasella P. M., Braunstein A. E., Rossi Fanelli A. (editors), Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis, Pergamon Press, London, 1963.

*Пептид активного центра*

Hughes R. C., Jenkins W. T., Fischer E. H., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 48, 1615 (1962).



*Исследование равновесий между промежуточными соединениями фермент — пиридоксаль — субстрат*

Jenkins W. T., Sizer I. W., J. Biol. Chem., 235, 620 (1960).

*Исследование быстротекущих промежуточных стадий*

Hammes G. G., Fasella P., Biochemistry, 3, 530 (1964).

Hammes G. G., Fasella P., J. Am. Chem. Soc., 85, 3929 (1963).

### Дегидрогеназы

#### Общие данные

Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., (editors), The Enzymes, 2nd ed., Vol. 7, Academic Press, New York, 1963.

*Стереоспецифичность в реакциях переноса водорода, катализируемых НАД-зависимыми дегидрогеназами*

Vennesland B., Westheimer F. H., in The Mechanism of Enzyme Action (McElroy W. D., and Glass B., editors), Johns Hopkins, Baltimore, 1954.

*Кинетика дегидрогеназ (стационарные состояния и быстротекущие стадии)*

#### Алкогольдегидрогеназа

Theorell H., Chance B., Acta Chem. Scand., 5, 1127 (1951).

Theorell H., McKinley McKee J. S., Acta Chem. Scand., 15, 1811 (1961).

Dalziel K., Acta Chem. Scand., 1 (Suppl. I), 27 (1963).

#### Малатдегидрогеназа

Raval D. N., Wolfe R. G., Biochemistry, 2, 220 (1963).

Czerlinski G., Schreck G., Biochemistry, 3, 89 (1964).

#### Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

Furfine C., Velick S. F., J. Biol. Chem., 240, 844 (1965).

Fahien L. A., Ibid., 241, 4115 (1966).

Kirschner K., Eigen M., Bittman R., Voigt B., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 56, 1661 (1966).

#### Активный центр глицеральдегидфосфатдегидрогеназы

Krimsky I., Racker E., J. Biol. Chem., 198, 731 (1952).

Harris I., Meriwether B. P., Park J. H., Nature, 198, 154 (1963).

### Аллостерические ферменты

#### Модели

Monod J., Wyman J., Changeux J. P., J. Mol. Biol., 12, 88 (1965).

Changeux J. P., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 497 (1963).

Koshland D. E., Ibid., 28, 473 (1963).

Ферменты  
Известия  
Atkinson D. E.  
Chem., 240, 26  
Аспартаттранскарба  
Gerhart J. C., P  
Biol., 28, 491  
Gerhart J. C., S  
Ферменты, трехмер  
Карбоксипептидаза  
Lipscomb W.  
wig M. L.,  
Biol., 19, 42  
Карбоангидраза  
Fridborg K., I  
berg B.,  
J. Mol. Bio  
Лизоцим  
Phillips D.  
Molecule,



*Изоцитратдегидрогеназа*

Atkinson D. E., Hathaway J. A., Smith E. C., J. Biol. Chem., 240, 2682 (1965).

*Аспартаттранскарбамилаза*

Gerhart J. C., Pardee A. B., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 491 (1963).

Gerhart J. C., Schachman H. K., Biochemistry, 4, 1054 (1965).

**Ферменты, трехмерная структура которых известна**

*Карбоксипептидаза*

Lipscomb W. N., Coppola J. C., Hartsuck J. A., Ludwig M. L., Muirhead H., Searl J., Steitz T. A., J. Mol. Biol., 19, 423 (1966).

*Карбоангидраза*

Fridborg K., Kannan K. K., Lilja A., Lundin J., Strandberg B., Strandberg R., Tilander B., Wirén G., J. Mol. Biol., 25, 505 (1967).

*Лизоцим*

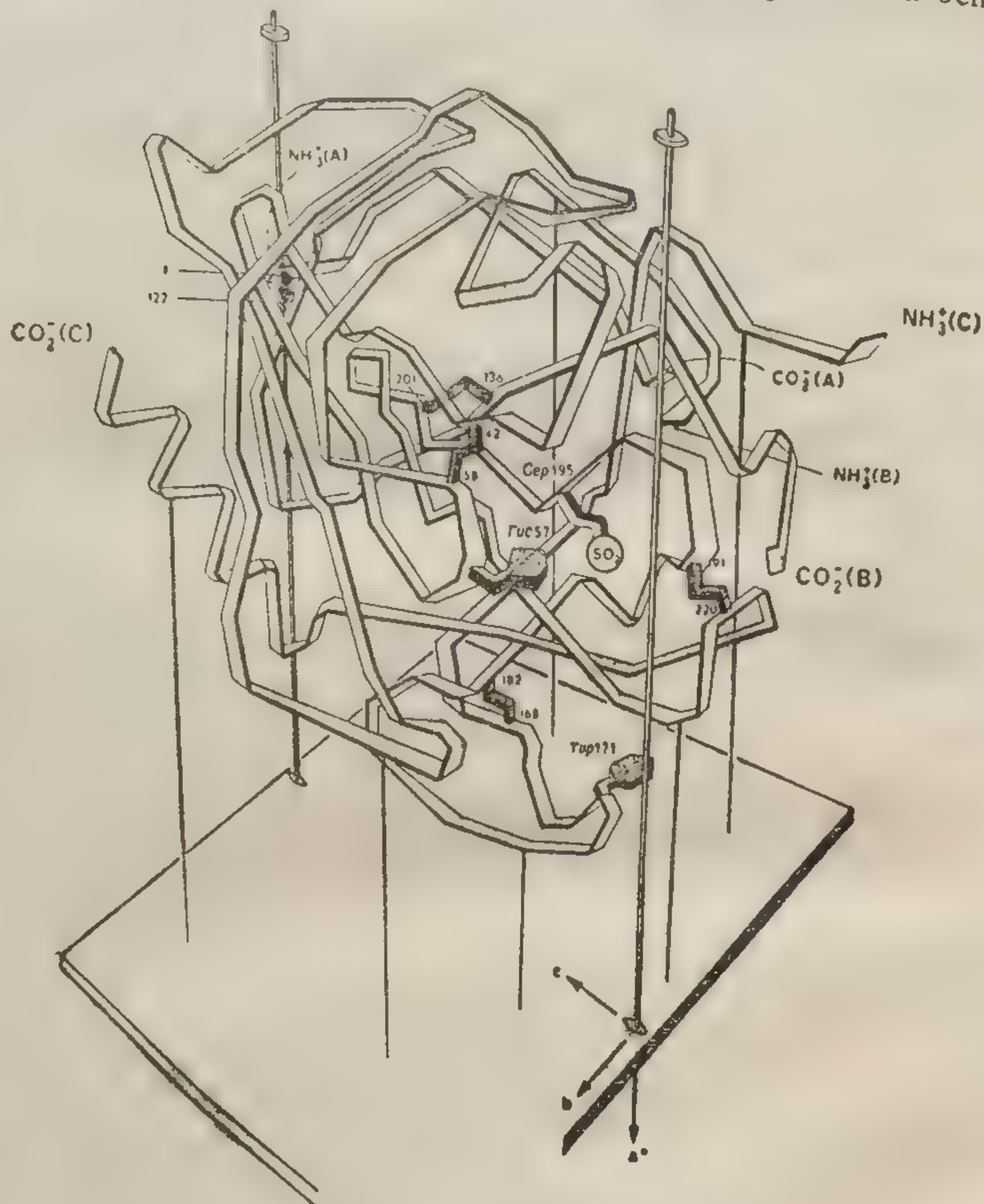
Phillips D. C., The Three-Dimensional Structure of an Enzyme Molecule, Scientific American, November 1966.



## ПРИЛОЖЕНИЯ I

### I. Проволочная модель $\alpha$ -химотрипсина

Проволочная модель моно-О-тозил-(Сер-195)- $\alpha$ -химотрипсина, изображенная на фиг. 121, построена на осно-



Фиг. 121. Модель  $\alpha$ -химотрипсина.

вании карт распределения электронной плотности (разрешение  $2\text{\AA}$ ). Следует отметить (в связи с текстом

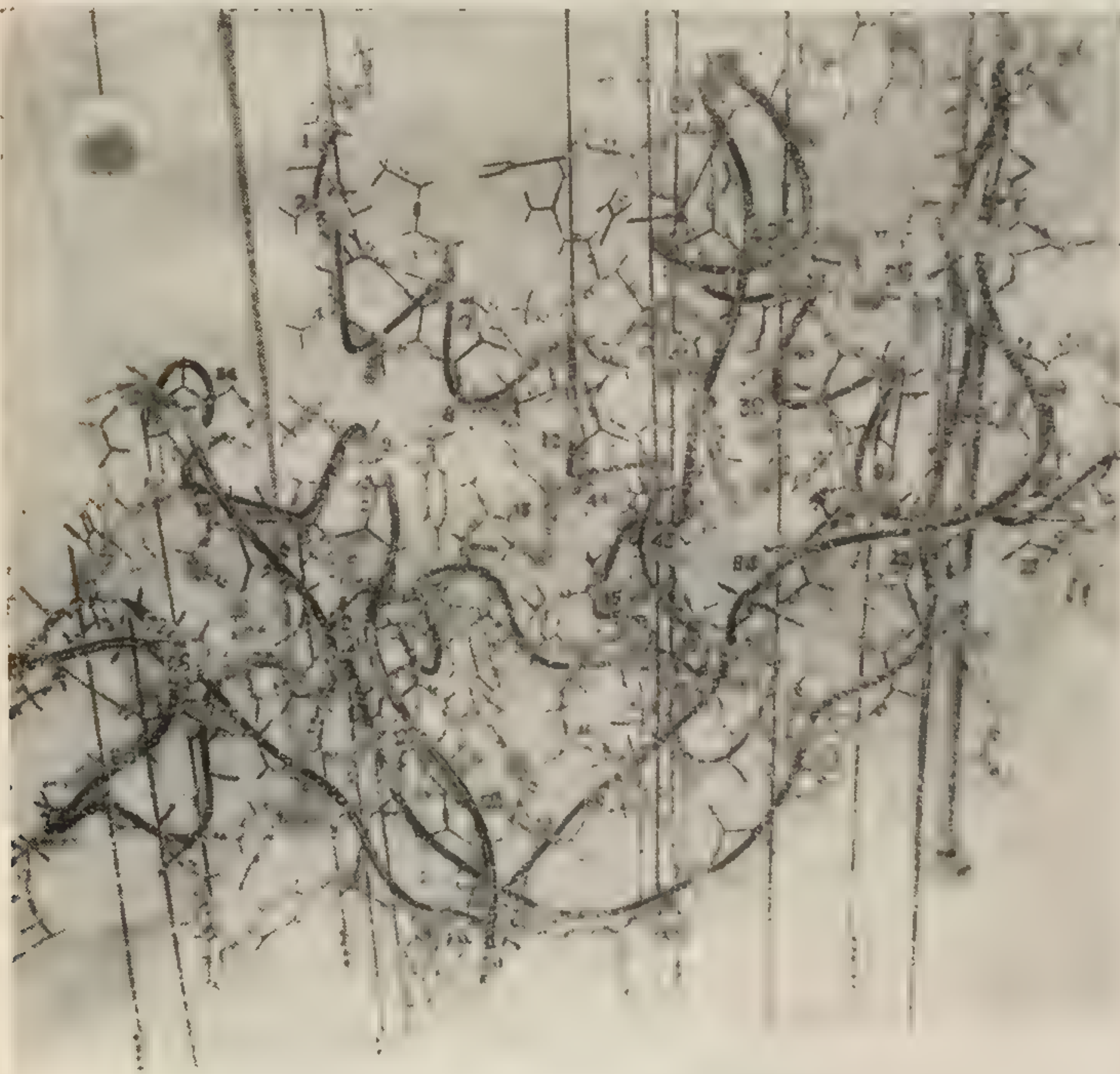
<sup>1</sup> Эти данные были получены уже после того, как книга была подготовлена к печати, и потому их не удалось включить в основной текст.



разд. 1, глава 8), что остаток Гис-57 и  $\text{NH}_3^+$ -группа (В) N-концевого изолейцина находятся по соседству с гидроксильной группой Сер-195.  $\text{NH}_3^+$ -группа изолейцина, по-видимому, контактирует с  $\text{CO}_2^-$ -группой Асп-194.

## II. Каркасная модель рибонуклеазы S

Каркасная модель рибонуклеазы S (рекомбинированного комплекса, образующегося после избирательного расщепления субтилизином пептидной связи между



Фиг. 122. Модель рибонуклеазы S.



остатками 20 и 21) изображена на фиг. 122. Распределение электронной плотности, рассчитанное по результатам рентгеноструктурного анализа кристаллов ферментного белка и трех его производных с тяжелыми атомами (разрешение 3,5 Å), позволяет определить конформацию главной цепи и боковых цепей (на основе общих стереохимических представлений с учетом данных о последовательности аминокислотных остатков). Рассматриваемая структура включает  $\alpha$ -спиральные участки (15%), гидрофобное «ядро» (15%) и существенную долю антипараллельной складчатой структуры ( $\beta$ -форма). Конфигурация главной цепи и расположение S—S-связей в общем очень сходны с соответствующими характеристиками структуры рибонуклеазы А (см. K a t h a, B e l l o w, H a r k e r, *Nature*, **213**, 862, 1967). Эта структура согласуется также с важнейшими имеющимися в литературе химическими данными о рибонуклеазе. В связи с соображениями, изложенными в разд. 2 данной главы, следует отметить, что оба остатка гистидина (12 и 119) и оба остатка лизина (7 и 41), которые, как полагают, участвуют в каталитическом механизме, попарно взаимно сближены.

#### ЛИТЕРАТУРА

##### I. $\alpha$ -Химотрипсин

Mathews B. W., Sieglar P. B., Henderson R., Blow D. M., *Nature*, **214**, 652 (1967).

##### II. Рибонуклеаза S

Wyckoff H. W., Hardmann K. D., Allewell N. M., Inagami T., Johnson L. N., Richards F. M., *J. Biol. Chem.*, **242**, 3984 (1967).

Предисловие к русскому изданию  
Глава I. Введение  
1. Краткий исторический обзор  
2. Аксиомы  
3. Действие фермента  
Литература

Глава II. Физические свойства  
и молекулярные характеристики  
1. Электростатические свойства  
2. Дисперсионные свойства  
3. Дипольные моменты  
4. Водородные связи  
5. Структура  
Литература

Глава III. Химические свойства  
1. Химическая структура  
2.  $\alpha$ -Спиральные участки  
3. Регулярные участки  
4. Последовательность аминокислот  
Литература

Глава IV. Кинетика  
и молекулярные характеристики  
1. Равновесие  
2. Обратимые реакции  
3. Ингибирование  
4. Ферментативные реакции  
5. Реакции  
6. Взаимодействие фермента с субстратом  
7. Методы исследования  
8. Аналитические методы



## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию . . . . .	5
Глава I. Введение . . . . .	7
1. Краткий исторический очерк . . . . .	7
2. Аксиомы . . . . .	10
3. Действие ферментов: прошлые, настоящие и будущие проблемы . . . . .	24
Литература . . . . .	25
Глава II. Физические силы взаимодействия между атомами и молекулами . . . . .	26
1. Электростатические силы . . . . .	28
2. Дисперсионные силы Лондона . . . . .	36
3. Дипольные взаимодействия . . . . .	40
4. Водородная связь . . . . .	40
5. Структура воды в связи со структурой белков . . . . .	43
Литература . . . . .	44
Глава III. Химические связи и структура белков . . . . .	45
1. Химические связи и конфигурация пептидов . . . . .	45
2. $\alpha$ -Спираль . . . . .	55
3. Регулярное строение цепи и структура белка в растворе . . . . .	63
4. Последовательность аминокислот и структура и функции белков . . . . .	74
Литература . . . . .	78
Глава IV. Кинетика ферментативных реакций и формальные модели катализа . . . . .	79
1. Равновесие и стационарное состояние . . . . .	80
2. Обратимые и необратимые реакции . . . . .	82
3. Ингибирование катализа необратимых реакций . . . . .	88
4. Фермент-субстратные промежуточные соединения . . . . .	98
5. Реакции с участием нескольких субстратов . . . . .	101
6. Взаимодействия нескольких центров и регуляция активности ферментов . . . . .	107
7. Методы кинетики стационарных состояний . . . . .	112
8. Аналитическая обработка данных, получаемых при изучении кинетики стационарного состояния . . . . .	120



9. Кинетика быстротекущих стадий . . . . .	126
10. Релаксационные методы и обратимые системы . . . . .	131
Литература . . . . .	142
<b>Глава V. Анатомия ферментов . . . . .</b>	<b>143</b>
1. Последовательность аминокислот в белках . . . . .	143
2. Дисульфидные мостики . . . . .	155
3. Специфическая агрегация полипептидов в олигомерные структуры . . . . .	160
4. Активные и неактивные конформации белка . . . . .	161
5. Денатурация белков . . . . .	164
6. Влияние модификации определенных аминокислотных остатков на активность ферментов . . . . .	171
Литература . . . . .	184
<b>Глава VI. Схемы механизмов и модели ферментативного ка-     тализа . . . . .</b>	<b>186</b>
1. Нуклеофильный и электрофильный катализ . . . . .	187
2. Общий кислотно-основной катализ . . . . .	197
3. Скорость переноса протонов . . . . .	202
4. Внутримолекулярный катализ . . . . .	207
Литература . . . . .	217
<b>Глава VII. Коферменты и кофакторы. Модели ферментов и     механизмы их действия . . . . .</b>	<b>218</b>
1. Катализ с участием пиридоксальфосфата . . . . .	221
2. Реакции с участием тиаминопирофосфата . . . . .	228
3. Пиридиновые нуклеотиды . . . . .	230
4. Тиоловые коферменты . . . . .	232
5. Флавины и гемсодержащие соединения . . . . .	244
Литература . . . . .	248
<b>Глава VIII. Ферментативный катализ; характерные примеры .</b>	<b>249</b>
1. $\alpha$ -Химотрипсин и другие ферменты с активным остатком серина . . . . .	250
2. Рибонуклеаза . . . . .	269
3. Ферменты, нуждающиеся в пиридоксальфосфате . . . . .	274
4. Дегидрогеназы, реагирующие с участием пиридиновых нуклеотидов . . . . .	285
5. Аллостерические ферменты: изоцитратдегидрогеназа и аспартаттранскарбамилаза . . . . .	296
6. Ферменты, трехмерная структура которых известна . . . . .	310
Литература . . . . .	326
<b>Приложения . . . . .</b>	<b>330</b>



С. Бернхард

Редактор М. Г. Дунина  
- Художник С. Бычков  
Художественный редактор Ю. Максимов  
Технический редактор Г. Алюлина  
Корректор Т. Пашковская

Сдано в производство 3/VII 1970 г.  
Подписано к печати 17/XI 1970 г.  
Бумага № 1 84×108<sup>1</sup>/<sub>32</sub>—5,25 бум. л.  
17,64 усл. печ. л.,  
Уч.-изд. л. 15,95. Изд. № 4/5552  
Цена, 1 р. 35 к. Зак. 699,

ИЗДАТЕЛЬСТВО „МИР“  
Москва, 1-й Рижский пер., 2

Ордена Трудового Красного Знамени  
Ленинградская типография № 2  
имени Евгении Соколовой  
Главполиграфпрома  
Комитета по печати  
при Совете Министров СССР  
Измайловский проспект, 29



ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

*Выйдет в свет в 1971 г.*

Маурер Г. Диск-электрофорез, перевод с немецкого, 14 а. л.

Единственное в мировой литературе практическое пособие по новому методу электрофореза в гелях. Метод диск-электрофореза за последние годы не только все шире применяется в научно-исследовательских лабораториях, но и внедряется в практику медицинских учреждений. В книге рассмотрены теоретические основы метода, способы очистки реактивов и приготовления геля, окрашивание и денситометрирование разделенных компонентов, результаты применения диск-электрофореза в различных областях биологии и медицины.

Предназначена для биологов, химиков и медиков самых различных специальностей, для работников клинических лабораторий.

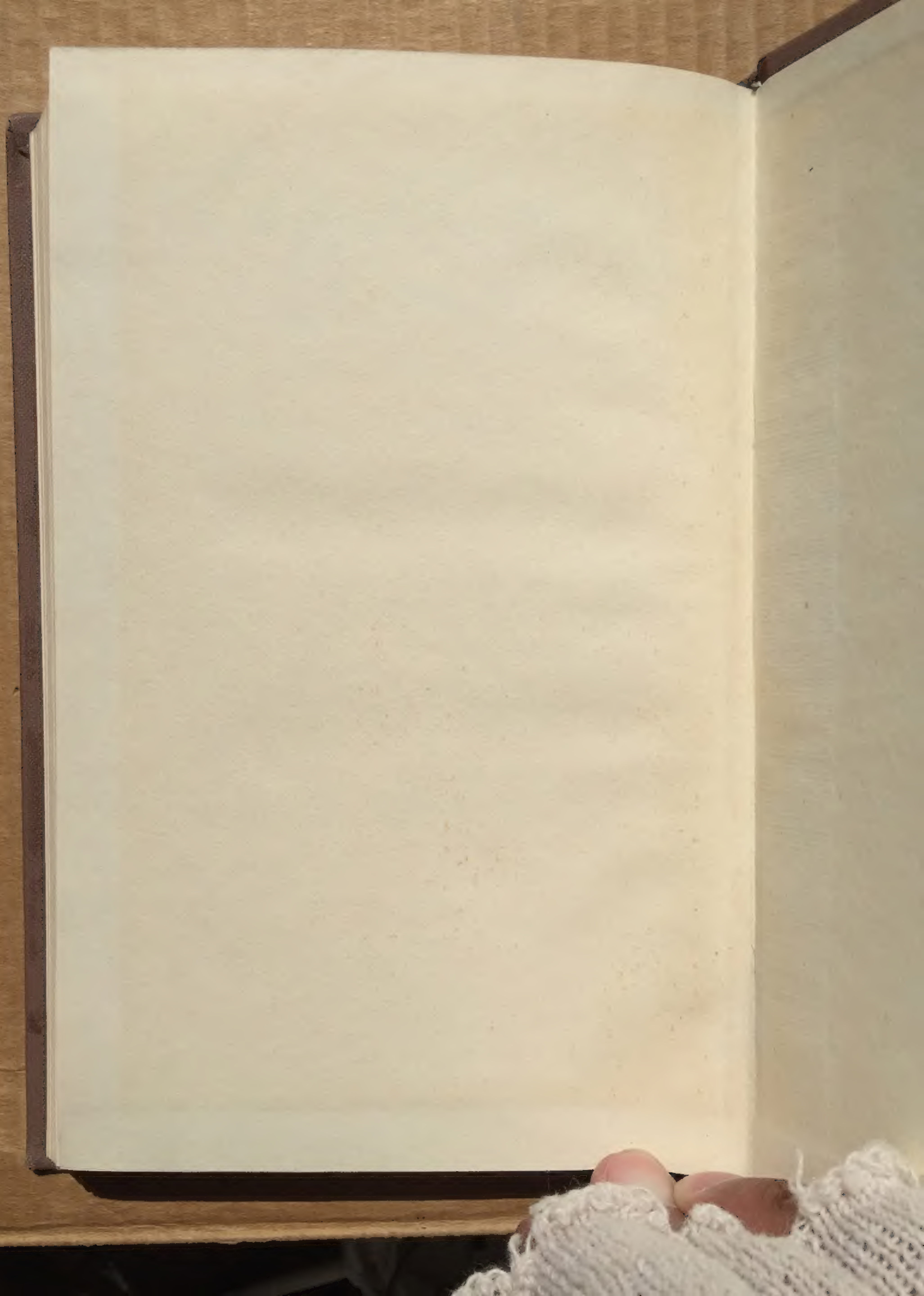


вод с

пак-  
электро-  
еза за  
приме-  
орато-  
инских  
етиче-  
еакти-  
и и  
поиен-  
трофо-  
меди-

аков и  
ностей,  
рий.











1935





С. БЕРНХАРД

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ФОРЕМЫ